BÜHLMANN fCAL™

ELISA

Calprotectin

EK-CAL 96 tests
EK-CAL2 192 tests

Revision date: 2014-08-14

BÜHLMANN LABORATORIES AG
Baselstrasse 55
CH - 4124 Schönenbuch, Switzerland
Tel.: +41 61 487 1212
Fax: +41 61 487 1234
info@buhlmannlabs.ch

English page 2
Deutsch Seite 6
Français page 11
Italiano pagina 16
Español página 21
Português página 25

ENGLISH

INTENDED USE

The BÜHLMANN fCAL™ ELISA kit is designed for the extraction and quantitative determination of human Calprotectin (MRP8/14; S100A8/S100A9) in stool samples (ref. 1-3).

PRINCIPLE OF THE ASSAY

The test allows for the selective measurement of Calprotectin-antigen by sandwich ELISA. A monoclonal capture antibody (mAb) highly specific to the Calprotectin heterodimeric and polymeric complexes (ref. 4-5), respectively, is coated onto the microtiter plate. Calibrators, controls and patients extracts are incubated at room temperature for 30 minutes. After a washing step a detection antibody (Ab) conjugated to horseradish peroxidase (HRP) detects the calprotectin molecules bound to the monoclonal antibody coated onto the plate. After incubation and a further washing step, tetramethylbenzidine (TMB) will be added (blue color formation) followed by a stopping reaction (change to yellow color). The absorption is measured at 450 nm.

REAGENTS SUPPLIED AND PREPARATION

Reagents	EK-CAL	EK-CAL2	Code	Reconstitution
	Quantity			
Extraction Buffer	3 bottles 125 mL	6 bottles x 125 mL	B-CAL-EX	Ready to use
Microtiter Plate precoated with anti-Calprotectin mAb	12 x 8 wells	2 x 12 x 8 wells	B-CAL-MP	Ready to use
Plate Sealer	3 pieces	6 pieces		
Wash Buffer Concentrate (10x) with preservatives	1 bottle x 100 mL	2 bottles x 100 mL	B-CAL-WB	Dilute each with 900 mL of deionized H_2O
Incubation Buffer with preservatives	2 bottles x 125 mL	3 bottles x 125 mL	B-CAL-IB	Ready to use
Calibrators A to E[1) 2)] Calprotectin in a buffer matrix with preservatives	5 vials x 1 mL	5 vials x 1 mL	B-CAL-CASET	Ready to use
Control Low / High[3)] human serum with preservatives	2 vials x 1 mL	2 vials x 1 mL	B-CAL-CONSET	Ready to use
Enzyme Label Anti-Calprotectin Ab conjugated to HRP	1 vial x 12 mL	2 vials x 12 mL	B-CAL-EL	Ready to use
TMB Substrate TMB in citrate buffer	1 vial x 12 mL	2 vials x 12 mL	B-TMB12	Ready to use
Stop Solution 0.25 M sulfuric acid	1 vial x 12 mL	2 vials x 12 mL	B-STS12	Ready to use **Corrosive agent**

Table 1

[1)] The actual Calprotectin concentration of the standards A to E are 4, 12, 40, 120 and 240 ng/mL, respectively. For extraction and subsequent sample dilution, a dilution of 1:2500 was taken into account for the assignment of calibrator A to E. The following concentrations have to be used for the lower range ELISA procedure: **10, 30, 100, 300 and 600 µg/g Calprotectin**.

[2)] If you choose the extended range ELISA procedure the following calibrator concentrations have to be used in the respective ELISA protocol: 30, 90, 300, 900 and 1800 µg/g Calprotectin.

[3)] The controls contain lot specific amounts of native human Calprotectin. Refer to the additional QC data sheet for actual concentrations.

STORAGE AND SHELF LIFE OF REAGENTS

Unopened Reagents	
Store at 2-8°C. Do not use past kit expiration date printed on the labels.	
Opened / Reconstituted Reagents	
Extraction Buffer	Store at 2-8°C until expiration d ate.
Microtiter Plate	Return unused strips immediately to the foil pouch containing the desiccant packs and reseal along the entire edge of zip-seal. Store until expiration date at 2-8°C.
Diluted Wash Buffer	Store for up to 6 months at 2-8°C.
Incubation Buffer	Store at 2-8°C until expiration date.
Calibrators	
Controls	
Enzyme Label	
TMB-Substrate	
Stop Solution	

Table 2

REAGENTS SUPPLIED SUPPLEMENTARY

Fecal Extraction Devices

CALEX® Cap Device	Package with 50 or 200 tubes respectively, each filled with extraction buffer, 5 ml / ready to use	B-CALEX-C50 B-CALEX-C200
Smart-Prep	50 tubes, spatulas, and base caps	B-CAL-RD
ScheBo® Quick-Prep™	50 tubes consisting of tube, cone & dosing tip, 1.3 mL, ready to use	B-CAL-SO50

Table 3

MATERIALS REQUIRED BUT NOT PROVIDED

Extraction Procedure

- 10 µL disposable inoculation loops
- 15 mL polypropylene tubes with screw caps required for standard extraction procedure; extraction devices (see above).
- Laminar flow work station
- Multi tube vortex mixer
- Precision balance (10-150 mg)
- Micro centrifuge (≥3000 g)
- Centrifuge ((≥500 g)

ELISA Procedure

- 10, 100 and 1000 µL precision pipettes with disposable tips.
- Disposable polystyrene or polypropylene tubes for the preparation of sample dilutions.
- 1000 mL cylinder to dilute the Wash Buffer.
- Microtiter plate washer (see Technical Precautions) or squeeze bottle for Wash Buffer.
- Microtiter plate rotator (see Technical Precautions).
- Blotting paper.
- Microtiter plate reader for measurement of absorbance at 450 nm.

PRECAUTIONS

SAFETY PRECAUTIONS

- The microtiter-plate, calibrators and controls of this test contain components of human origin. Although tested and found negative for HBV surface antigen, HCV and HIV1/2 antibodies, the reagents should be handled as if capable of transmitting infections and should be handled in accordance with Good Laboratory Practices (GLP) using appropriate precautions.

- **Substrate and Stop Solution**: The Substrate TMB (B-TMB12) contains Tetramethylbenzidine, and hydrogen peroxide (H_2O_2). The Stop Solution (B-STS12) contains sulfuric acid (0.25 M). Each of those reagents is irritant to eyes, skin and mucous membranes. Avoid contact with Eyes, skin and cloths. After contact with eyes or skin, wash immediately with plenty of water.
- Unused solution should be disposed of according to local State and Federal regulations.

TECHNICAL PRECAUTIONS

Kit components

- **Residues in the microtiter plate** wells result from the production process. They are removed in the washing step (Assay procedure step 3) and do not affect the results.
- Read carefully the instructions prior to carrying out the test. Test performance will be adversely affected, if reagents are incorrectly diluted, modified or stored under conditions other than those as detailed in this instruction for use.
- Components must not be used after the expiry date printed on the labels.
- Do not mix different lots of reagents.
- Every effort should be made to ensure that no cross contamination occurs between reagents, samples or between wells.
- Let the reagents adjust to reach room temperature. Mix well (vortex) the reagents before use.
- Microwells cannot be re-used.

Extraction:

- To receive quantitative results it is important to homogenize the stool sample completely with the extraction buffer. Avoid contamination at the top of the tube - insoluble (undigested) components can still be in the tube after extraction.

ELISA Procedure:

- In the ELISA procedure the **washing step is essential** to guarantee reproducible results. A **minimal incubation time** of the Wash Buffer in the wells **of at least 20 seconds** must be ensured each time.
- When using **automated washer,** BÜHLMANN strongly recommends using “plate mode” i.e. each process step (dispense/aspiration) is performed on all of the strips sequentially, before processing to the next process step. Thus, the minimal incubation time is guaranteed.
- The indicated no. of **washing cycles is mandatory** to ensure reproducible results.
- Set the **Plate rotator** (shaker) at 450 rpm (<10 Hz). Higher rotation frequency may cause poor dilution linearity at values between 300/900 and 600/1800 µg/g. Orbital rotation instead of reciprocal shaking should be used.
- To ensure a complete antigen/antibody interaction, the **incubation time in step 5** must be at least 30 minutes. Moderately longer incubation time (up to 5 minutes) has no influence to the final outcome.
- The Enzyme Label is inactivated by oxygen and is highly sensitive to sodium azide, thimerosal, hypochlorous acid and aromatic chlorohydrocarbons often found in laboratory water supplies. Therefore, use only deionized high quality water.
- A new standard curve must be generated each time the assay is performed. Vertical alignment is recommended.
- If the initial concentration of an unknown sample reads above the concentration of the highest Calibrator, Calibrator E, the sample must be further diluted with Incubation Buffer and assayed again according to the assay procedure. The resulting total dilution factor must be taken into account for the calculation of results.

SPECIMEN COLLECTION AND STORAGE

If the extraction devices are used less than 1 g of native stool sample is needed for the extraction procedure.
Collect stool samples into plain tubes. The samples can be stored refrigerated at 2-8℃ for at least 6 days.
The extracts are stable for at least 7 days at 2-8ºC and for at least 24 months at -20ºC.

Important: The sample must be collected without any chemical or biological additions in the collection device.

STANDARDIZATION

The test BÜHLMANN fCAL™ ELISA is calibrated against purified MRP8/14 from human granulocytes.

STOOL SAMPLE EXTRACTION

Standard extraction procedure

1. Label and weigh (tare) the empty polypropylene tube together with the inoculation loop.
2. Take out 50 to 100 mg of the stool sample by means of the inoculation loop and place it into the pre-weighted tube.
3. Calculate the net amount of sample, break off the inoculation loop and leave the lower part of the loop in the tube.
4. Add Extraction Buffer according to the formula

   x mg stool **x 49** = y µl extraction buffer

   (e.g. 50 mg stool + 2450 µl buffer) to the tube and close the tube
5. Homogenize the sample on a multi tube vortexer by vigorous shaking (at highest speed) for 30 minutes.
6. Transfer the homogenate into a 2 mL Eppendorf tube and centrifuge in a microcentrifuge for 5 minutes at 3’000 x g.
7. Take the supernatant into a fresh, labeled tube and continue with the ELISA procedure.

Extraction procedures using fecal extraction devices:
The extraction procedure is described and illustrated in the instruction for use delivered with the respective extraction device.

1. CALEX® Cap Device (Code B-CALEX-C50/B-CALEX-C200): The extraction tubes are prefilled with extraction buffer.

Important: After extraction, centrifuge the CALEX® Cap Device for 5 minutes at 500 x g and continue with the ASSAY PROCEDURE.

2. Fecal Extraction Device Roche (Code 10745804322) or BÜHLMANN Smart-Prep (Code: B-CAL-RD).

3. ScheBo® Quick-Prep™ (Code B-CAL-SO50): The extraction tubes are prefilled with extraction buffer.

Important: After extraction with BÜHLMANN Smart Prep and ScheBo® Quick-Prep™, centrifuge the tubes for 5 minutes at 3’000 x g. Alternatively, transfer the homogenate into a 2 mL Eppendorf tube and centrifuge it in a microcentrifuge for 5 minutes at 3’000 x g. Decant the supernatant into a fresh, labeled tube and continue with the ASSAY PROCEDURE.

WORKING RANGE

The assay can be performed according to the following procedures – lower or extended range ELISA procedure. Which procedure is to be chosen depends on the expected Calprotectin concentration of the samples. For samples up to 600 µg/g choose the lower range procedure (working range 10 – 600 µg/g)). If the samples tend to exceed 600 µg/g choose the extended range procedure (working range 30 – 1800 µg/g).

ASSAY PROCEDURE

Important:
Allow the reagents to equilibrate to 18-28 ℃ prior to use.
Only dilute stool extracts. Standards and controls are ready to use.

1. **SAMPLE DILUTION OPTIONS**

WORKING RANGE 10 – 600 µg/g

1.1. **Manual weighing procedure, Smart Prep, or ScheBo® Quick-Prep™**: Dilute the stool extracts 1:50 with Incubation Buffer (e.g. 20 µL extract and 980 µL incubation buffer) and mix well. Let the samples equilibrate for at least 5 minutes at 18-28℃ prior to proceeding to step 4c.

1.2. **CALEX® Cap Device:** Dilute the stool extracts 1:5 with Incubation Buffer (e.g. 100 µL extract and 400 µL incubation buffer) and mix well. Let the samples equilibrate for at least 5 minutes at 18-28℃ prior to proceeding to step 4c.

WORKING RANGE 30 – 1800 µg/g

The working range can be extended by a factor of 3, if you dilute the samples 1:7500 instead of 1:2500. This procedure is recommended, if high Calprotectin concentrations are to be expected. Precision and linearity of the assay allow for this extension of the measuring range.

1.1. **Manual weighing procedure, Smart Prep, or ScheBo® Quick Prep™: Dilute the stool extracts 1:150 with** Incubation Buffer (e.g. 20 µL extract and 2980 µL incubation buffer) and mix well. Let the samples equilibrate for at least 5 minutes at 18-28℃ prior to proceeding to step 4c.

1.2. **CALEX® Cap Device:** Dilute the stool extracts 1:15 with Incubation Buffer (e.g. 50 µL extract and 700 µL incubation buffer) and mix well. Let the samples equilibrate for at least 5 minutes at 18-28℃ prior to proceeding to step 4c.

2. Prepare a plate with sufficient strips to test the required number of calibrators, controls and diluted samples. Remove excess strips from the holder and re-seal them in the foil pouch together with the desiccant packs **without delay**. Store refrigerated.

3. Wash the coated wells twice using at least 300 µL of Wash Buffer per well. Empty the wells and tap the plate firmly onto blotting paper.

Important: For every of the **three wash steps** a minimal incubation time of **at least 20 seconds** of the Wash Buffer in the wells must be ensured (see Technical Precautions – ELISA Procedure).

4a. Pipet 100 µL of Incubation Buffer (Blank) and

Pipet 100 µL of Calibrator A-E into the respective wells.

4b. Pipet 100 µL of the Low and High Controls into the respective wells.

4c. Pipet 100 µL of each diluted sample into the subsequent wells.

5. Cover the plate with a plate sealer, and incubate for 30 + max. 5 min on a plate rotator set at 450 rpm at 18-28 ℃ (see Technical Precautions – ELISA Procedure) .

6. Remove and discard the plate sealer. Empty the wells and wash three times using at least 300 µL of Wash Buffer per well (see Technical Precautions – ELISA Procedure). Empty the wells and tap the plate firmly onto blotting paper.

7. Pipet 100 µL of Enzyme Label to each well.

8. Cover the plate with a plate sealer, and incubate for 30 ± 5 min on a plate rotator set at 450 rpm at 18-28 C.

9. Remove and discard the Plate Sealer. Empty the wells and **wash five times** using at least 300 µL of Wash Buffer per well. Empty the wells and tap the plate firmly onto blotting paper.

Important: Allow the TMB Substrate Solution to equilibrate to 18-28 C.

10. Pipet 100 µL of the TMB Substrate Solution to all wells.

11. Cover the plate with a plate sealer, protect the plate from direct light and incubate for 15 ± 2 min on a plate rotator set at 450 rpm at 18-28℃.

12. Pipet 100 µL of Stop Solution to all wells. Remove air bubbles with a pipette tip. Proceed to step 13 within 30 min.

13. Read the absorbance at 450 nm in a microtiter plate reader.

RESULTS & CALCULATION

Read the absorbance at 450 nm in a microplate reader for each calibrator, control and sample using a 4 PL fit with blank subtraction and have the concentration of the samples calculated.

WORKING RANGE 10 – 600 µg/g

If you choose the lower range ELISA procedure, the following calibrator concentrations have to be used in the respective ELISA protocol: **10, 30, 100, 300 and 600 µg/g Calprotectin.**
Additional dilution factors have to be multiplied with the results to obtain the final results.

Refer to Table 19 and Figure 1 for typical data (results and standard curve). *These results and standard curve are provided for demonstration purposes only. A standard curve must be generated for each set of samples to be assayed.*

WORKING RANGE 30 – 1800 µg/g

If you choose the extended range ELISA procedure, the following calibrator concentrations have to be used in the respective ELISA protocol: **30, 90, 300, 900 and 1800 µg/g Calprotectin.**
Additional dilution factors have to be multiplied with the results to obtain the final results.

Refer to Table 24 and Figure 3 for typical data (results and standard curve). *These results and standard curve are provided for demonstration purposes only. A standard curve must be generated for each set of samples to be assayed.*

PERFORMANCE CHARACTERISTICS

WORKING RANGE: 10 – 600 µg/g

Assay performance characteristics have been established in duplicates.

Intra-Assay Precision: 4.7 %. The intra-assay precision was calculated from 20 pairs of values from 3 extracted stool samples assayed in a single run according to the assay procedure. The values are presented in Table 20.

Inter-Assay Precision: <15 %. The inter-assay precision of the ELISA was calculated from 5 extracted stool samples. The aliquots were tested according to the assay procedure in 10 different runs by three technicians using 2 kit lots in two different labs. The values are presented in Table 21.

Detection limit (LoB): <10 µg/g. Twenty duplicates of Incubation Buffer were assayed in a single run. Mean and standard deviation were calculated for the absorbance values. The minimal detectable dose of Calprotectin was calculated to be clearly below Calibrator A (10 µg/g) by adding two standard deviations to the mean absorbance and intersecting this value with the standard curve obtained in a new run.

Detection limit (LoQ): <10 µg/g. Ten stool samples with values between 5.2 and 1254 µg/g Calprotectin were assayed 20 times in duplicates in one assay. The %CV and the mean values were calculated for each sample. The functional sensitivity was observed at 15 % CV. The resulting precision profile (Figure 2) allows the precise measurement within the whole standard range from 10 to 600 µg/g.

Dilution Linearity: 103 %. Seven stool samples with elevated Calprotectin values were extracted according to the assay procedure. The extracts were diluted with Incubation Buffer and subsequently assayed according to the assay procedure. The expected values were calculated from the observed value found with the first dilution. The results are presented in Table 22.

Spiking Recovery: 100 %. Two extracted stool samples were spiked with different amounts of diluted, Calprotectin containing human serum. The samples were measured before and after spiking according the assay procedure. The results are presented in
Table 23.

Crossreactivity: <0.1 %. Incubation Buffer spiked with different amounts of recombinant MRP8 and MRP14 were measured according to the assay procedure. The values are presented in Table 28

WORKING RANGE: 30 – 1800 µg/g

Intra-Assay Precision: 4.0 %. The intra-assay precision (mean) was calculated from the results of 20 duplicates from 3 extracted stool samples assayed in a single run according to the assay procedure. The values are presented in Table 25.

Inter-Assay Precision: <15 %. The inter-assay precision of the ELISA was calculated from 5 extracted stool samples. The aliquots were tested according to the assay procedure in 10 different runs by three technicians using 2 kit lots in two different labs. The values are presented in Table 26.

Detection limit (LoQ): <30 µg/g. 18 stool samples with values between 10.8 and 2080 µg/g Calprotectin were measured 20 times in one assay. The % CV and the mean values were calculated for each sample. The LoQ was observed at 15 % CV. The resulting precision profile allows the precise measurement within the whole standard range from 30 to 1800 µg/g. The results are presented in Figure 4.

Dilution Linearity: 102 %. Five stool samples with elevated Calprotectin concentrations were extracted according to the assay procedure. The extracts were diluted with Incubation Buffer and subsequently assayed according to the assay procedure. The expected values were calculated from the observed value found with the first dilution. The results are presented in Table 27.

INTERPRETATION OF RESULTS

Estimation of faecal Calprotectin is a reliable and easy way to distinguish organic from functional gastrointestinal diseases.

In a clinical study 401 symptomatic patients scheduled for colonoscopy were investigated. Endoscopy examination showed 273 patients with functional diseases whereas 128 patients had various organic diseases (colitis, Crohn's, ulcers, diverticulitis, polyps, adenomas, cancer, or infectious diseases) (ref.12).

ROC curve analysis (AUC: 0.935) resulted in an optimal clinical cut-off at 50 µg/g. Applying this cut-off, a clinical sensitivity and specificity of 84.4% and 94.5%, respectively can be reached in the differentiation between organic and functional diseases (see Table 29).

Faecal Calprotectin levels from adults and children are comparable, whereas levels of newborns can be significantly increased (ref. 8).

These data support the following recommendation for interpretation of results:

Normal values below 50 µg/g:

Calprotectin values <50 µg/g are not indicative of inflammation in the gastrointestinal tract. Patients with low Calprotectin levels are likely not to be in need of invasive procedures to determine the inflammation cause (ref. 12).

Elevated values between 50 and 200 µg/g:

Calprotectin values between 50 and 200 µg/g can represent mild organic disease such as inflammation caused by NSAIDs, mild diverticulitis and IBD in remission phase. The low inflammatory response shown within this range may suggest repeating the measurement and performing further investigations.

Elevated values above 200 µg/g:

Calprotectin values >200 µg/g are indicative of active organic disease with inflammation in the gastrointestinal tract. Appropriate further investigative and curative procedures by specialists are suggested.

The cut-off level suggested for adults (50 µg/g) can also be used for children aged from 4 to 17 years regardless of sex (ref. 9).

QUALITY CONTROL

Thorough understanding of this instruction is necessary for the successful use of the product. Reliable results will be obtained only by precise laboratory techniques (current GLP guidelines) and accurately following this instruction for use.

Since there is no control for Calprotectin commercially available, we recommend using a pool of positive stool extractions for internal quality control.

The reproducibility of standard curve parameters and control values should be within established limits of laboratory acceptability. The confidence limits for the Controls are lot-specific and printed on the additional QC data sheet.

If the precision of the assay does not meet the established limits and repetition has excluded errors in technique, check the following issues: i) pipetting, temperature controlling and timing devices ii) ELISA reader settings iii) expiration dates of reagents iv) storage and incubation conditions v) TMB Substrate Solution should be colorless vi) purity of water.

PERFORMANCE LIMITATIONS

- Reagents delivered with this kit are being optimized for the determination of Calprotectin from human stool samples.
- Test results should be interpreted in conjunction with information available from clinical assessment of the patient and other diagnostic procedures.

DEUTSCH

ANWENDUNGSZWECK

Der BÜHLMANN fCAL™ ELISA Kit wird eingesetzt für die quantitative Bestimmung von humanem Calprotectin (MRP8/14; S100A8/S100A9) aus extrahierten Stuhlproben (Ref. 1-3).

PRINZIP DER METHODE

Calprotectin wird selektiv mittels Sandwich ELISA bestimmt. Die Kavitäten der Mikrotiterplatte sind mit einem monoklonalen Fangantikörper (mAk) beschichtet, welcher gegenüber heterodimerem und polymerem Calprotectin hoch spezifisch ist (Ref. 4-5). Das Calprotectin in den Kalibratoren, Kontrollen und Patientenproben bindet während der Inkubation von 30 Minuten bei Raumtemperatur an den Fangantikörper. Nach einem Waschschritt wird das am mAk gebundene Calprotectin durch einen mit Meerrettich Peroxidase (HRP) konjugierten Nachweisantikörper (Ak) detektiert. Nach der Inkubation und einem weiteren Waschschritt, wird Tetramethylbenzidin (TMB) zugegeben. Die Enzym-Substratreaktion führt zu einem blaugefärbten Produkt, sie wird durch Zugabe der Stopp-Lösung gestoppt. Dabei findet gleichzeitig ein Farbumschlag nach Gelb statt. Die bei einer Wellenlänge von 450 nm gemessene optische Dichte der Lösung, ist direkt proportional zur Calprotectinkonzentration der Probe.

GELIEFERTE REAGENZIEN UND VORBEREITUNG

Reagenz	EK-CAL	EK-CAL2	Art.-Nr.	Rekonstitution
	Menge			
Extraktions-Puffer	3 Flaschen zu 125 mL	6 Flaschen zu 125 mL	B-CAL-EX	Gebrauchsfertig
Mikrotiter-Platte Beschichtet mit anti-Calprotectin mAk	8 x 12 Kavitäten	2 x 8 x 12 Kavitäten	B-CAL-MP	Gebrauchsfertig
Abdeckfolien	3 Stück	6 Stück		
Waschpuffer Konzentrat 10x Konservierungsstoffe	1 Flasche zu 100 mL	2 Flaschen zu 100 mL	B-CAL-WB	Jede mit 900 mL deionisiertem H_2O verdünnen
Inkubationspuffer Konservierungsstoffe	2 Flaschen zu 125 mL	3 Flaschen zu 125 mL	B-CAL-IB	Gebrauchsfertig
Kalibratoren A-E[1) 2)] Calprotectin in proteinhaltigem Puffer; Konservierungsstoffe	5 Röhrchen zu 1 mL	5 Röhrchen zu 1 mL	B-CAL-CASET	Gebrauchsfertig
Kontrolle tief / hoch[3)] Humanserum mit Konservierungsstoffen	2 Röhrchen zu 1 mL	2 Röhrchen zu 1 mL	B-CAL-CONSET	Gebrauchsfertig
Enzym-Marker anti-Calprotectin Ak konjugiert mit HRP	1 Flasche zu 12 mL	2 Flaschen zu 12 mL	B-CAL-EL	Gebrauchsfertig
TMB-Substrat-Lösung Citrat-gepufferte TMB Lösung	1 Flasche zu 12 mL	2 Flaschen zu 12 mL	B-TMB12	Gebrauchsfertig
Stopp-Lösung 0.25 M H_2SO_4	1 Flasche zu 12 mL	2 Flaschen zu 12 mL	B-STS12	Gebrauchsfertig **korrosiv**

Table 4

[1] Die tatsächliche Konzentrationen der Kalibratoren A-E betragen 4, 12, 40, 120 und 240 ng/mL Calprotectin. Für die Extraktion und die Probenverdünnung wurde eine Gesamtverdünnung von 1:2500 bei den Konzentrationen der Kalibratoren A-E bereits berücksichtigt.
Sie werden für die „Lower Range“ ELISA Variante folgendermassen angegeben: **10, 30, 100, 300 und 600 µg/g** Calprotectin.

[2] Wenn Sie die „Extended Range“ ELISA Variante verwenden, geben Sie die folgenden Kalibratorkonzentrationen in das entsprechende ELISA Auswerteprotokoll ein: **30, 90, 300, 900 und 1800 µg/g** Calprotectin.

[3] Die Kontrollen enthalten Lot-abhängige Konzentrationen von nativem, humanem Calprotectin. Die genauen Konzentrationen werden auf dem QC Datenblatt angegeben.

LAGERUNG UND HALTBARKEIT DER REAGENZIEN

Ungeöffnete Reagenzien	
Bei 2-8℃ lagern. Zu verwenden bis zum Verfallsdatu m, angegeben auf der Packungsetikette.	
Geöffnete / rekonstituierte Reagenzien	
Extraktions-Puffer	Bis zum Verfallsdatum bei 2-8℃ lagern.
Mikrotiterplatte	Ungebrauchte Streifen sofort in die mit Trockenmittel versetzte Packung zurückbringen. Packung gut verschliessen. Bei 2-8℃ bis zum Verfallsdatum haltbar .
Waschpuffer	Bei 2-8℃ bis 6 Monate nach der Verdünn ung lagern.
Inkubations-Puffer	Bis zum Verfallsdatum bei 2-8℃ lagern.
Kalibratoren	
Kontrollen	
Enzym-Marker	
TMB-Substrat	
Stopp-Lösung	

Table 5

REAGENTIEN GELIEFERT AUF BESTELLUNG

Extraktionsbesteck für Stuhlproben

CALEX® Cap Device	Packungen zu 50 und 200 Röhrchen, gefüllt mit Extraktionspuffer, 5 mL / gebrauchsfertig	B-CALEX-C50 B-CALEX-C200
Smart-Prep	50 Röhrchen, Spatel und Böden	B-CAL-RD
ScheBo® Quick-Prep™	50 Röhrchen bestehend aus Röhrchen, Konus und Dosierspitze, 1.3 mL, gebrauchsfertig	B-CAL-SO50

Table 6

ERFORDERLICHE Hilfsmittel, Nicht im Lieferumfang enthalten

Extraktion
- 10 µL Einweg Impfschlingen
- 15 mL Polypropylen Einwegröhrchen mit Schraubverschluss für die Standardextraktion
- Laminar Flow Arbeitsplatz
- „Multi Tube“ Vortex Mixer
- Präzisionswaage (10-150 mg)
- Mikrozentrifuge (≥3000 x g)
- Zentrifuge (≥500 x g)

ELISA
- Präzisionspipetten mit Einwegspitzen für 10, 100 und 1000 µL.
- Polystyrol oder Polypropylen Einwegröhrchen zur Durchführung von Probenverdünnungen.
- 1000 mL Messkolben zur Verdünnung des Waschpuffer Konzentrats.
- Mikrotiterplattenwaschautomat oder Spritzflasche für Waschpuffer siehe technische Vorsichtsmassnahmen, Seite 7-8).
- Mikrotiterplattenschüttler (siehe technische Vorsichtsmassnahmen).
- Saugfähiges Papier.
- Mikrotiterplatten-Photometer mit optischem Filter (450 nm).

VORSICHTSMASSAHMEN

SICHERHEITSMASSNAHMEN

- Die Mikrotiterplatte, Kalibratoren und Kontrollen enthalten Bestandteile humanen Ursprungs. Obwohl sie negativ in Tests für HBV Oberflächenantigen, HCV und HIV1/2 Antikörper waren, sollten gemäss Good Laboratory Practice (GLP) als potentiell infektiös behandelt werden und die entsprechenden Sicherheits-vorkehrungen getroffen werden.
- Substrat- und Stopp-Lösung: Das Substrat (B-TMB12) enthält Tetramethylbenzidin und Wasserstoffperoxid (H_2O_2). Die Stopp-Lösung (B-STS12) enthält 0.25 M Schwefelsäure (H_2SO_4). Jeder dieser Reagenzien reizt die Augen, die Haut und die Schleimhautmembranen. Berührung mit den Augen, der Haut und die Bekleidung vermeiden. Nach Berührung sofort mit viel Wasser spülen.
- Ungebrauchte Lösungen sollten gemäss der gesetzlichen Bestimmungen entsorgt werden.

TECHNISCHE VORSICHTSMASSNAHMEN

Kit Komponenten
- Auf Grund des Produktionsprozesses kann es **Rückstände in den Wells der Mikrotiterplatten** haben. Sie werden mit dem 1. Waschen (Assaydurchführung Schritt 3) entfernt und haben keinen Einfluß auf die Ergebnisse.
- Lesen Sie die Arbeitsanleitung sorgfältig vor der Testdurchführung. Die Testqualität kann negativ beeinflusst werden, wenn die Reagenzien nicht korrekt verdünnt oder verändert werden sowie nicht entsprechend der in dieser Anleitung angegebenen Lagerungsbedingungen gelagert werden.
- Die Reagenzien dürfen nach Ablauf des Verfallsdatums nicht mehr verwendet werden.
- Mischen Sie nicht Reagenzien verschiedener Kitlots.
- Vermeiden Sie unter allen Umständen, dass es zu einer Kontamination zwischen verschiedenen Reagenzien, Proben und zwischen den Wells kommt.
- Die Reagenzien vor Gebrauch auf Raumtemperatur äquilibrieren lassen und mischen (vortexen).
- Mikrotiterstreifen dürfen nicht wiederverwendet werden.

Extraktion
- Um die Extraktion quantitativ durchzuführen, ist es wichtig, dass die eingewogene Stuhlprobe vollständig homogenisiert wird. Kontaminationen am oberen Rand des Extraktionsröhrchens sollten vermieden werden – unlösliche (unverdaute) Bestandteile können auch nach der Extraktion vorhanden sein.

ELISA
- Die korrekte Durchführung der in der Arbeitsvorschrift beschriebenen **Waschschritte** ist essentiell, um reproduzierbare Resultate zu garantieren. Eine **minimale Inkubationszeit des Waschpuffers** in der Kavität **von mindestens 20 Sekunden** muss bei jedem Waschschritt eingehalten werden.
- Wird ein **Waschautomat** eingesetzt, muss der „Platten-Modus“ gewählt werden. Das heisst, dass jeder Schritt (Einfüllen) erst über die gesamte Platte ausgeführt wird, bevor der nächste Schritt (Absaugen) gestartet wird. Somit kann die minimale Inkubationszeit gewährleistet werden.

- Die angegebene Anzahl von **Waschschritten muss eingehalten** werden, um reproduzierbare Resultate zu gewährleisten.
- **Der Mikrotiterplattenschüttler** muss auf ca. 450 rpm (<10 Hz) eingestellt sein. Eine höhere Rotationsgeschwindigkeit kann zu einer schlechteren Verdünnungslinearität bei Werten zwischen 300/900 und 600/1800 µg/g führen. Eine Rotationsbewegung sollte einer Horizontalbewegung vorgezogen werden.
- Damit die Antigen-Antikörper-Reaktion vollständig ablaufen kann, muss die **Inkubationszeit in Schritt 5** mindestens 30 Minuten betragen. Leicht längere Inkubationszeiten (bis zu 5 Minuten) zeigen dagegen keinen Einfluss auf das Endresultat.
- Die als Enzymmarker verwendete Peroxidase (HRP) wird durch Sauerstoff inaktiviert und ist sehr empfindlich gegen Natriumazid, Thimerosal, Hypochlorsäure und aromatische chlorierte Kohlenwasserstoffe, die im Wasser vorkommen können. Daher sollte nur deionisiertes oder destilliertes Wasser von hoher Qualität verwendet werden.
- Die Standardkurve muss bei jedem Testansatz bestimmt werden. „Vertikale Anordnung" wird empfohlen.
- Falls die Konzentration einer Probe grösser als diejenige des höchsten Kalibrators (E) ist, muss diese Probe mit Inkubationspuffer verdünnt und erneut getestet werden. Der zusätzliche Verdünnungsfaktor muss bei der Konzentrationsberechnung dieser Probe berücksichtigt werden.

UNTERSUCHUNGSMATERIAL UND LAGERUNG

Für die Extraktion werden weniger als 1 g native Stuhlprobe benötigt.
Die Stuhlprobe muss in einem leeren Entnahmeröhrchen gesammelt werden und kann mindestens 6 Tage bei 2-8 ℃ gelagert werden.
Die Extrakte sind für mindestens 7 Tage bei 2-8 ℃ und mindestens 24 Monate bei -20℃ stabil.
Wichtig: Die Stuhlproben dürfen nicht mit chemischen oder biologischen Zusätzen versetzt werden.

STANDARDISIERUNG

Der Test BÜHLMANN fCAL™ ELISA ist gegen gereinigtes MRP8/14 aus humanen Granulocyten kalibriert.

STUHLPROBENEXTRAKTION

Standardextraktionsanleitung

1. Die leeren Polypropylenröhrchen beschriften und zusammen mit der Einweg-Impfschlinge austarieren.
2. Mit Hilfe der Impfschlinge 50-100 mg Stuhlprobe entnehmen und in das vorgewogene Röhrchen geben.
3. Das Nettogewicht der entnommenen Probe bestimmen, die Impfschlinge abbrechen und den unteren Teil davon im Röhrchen belassen.
4. Extraktionspuffer entsprechend der Formel

   x mg Stuhl **x 49** = y µl Extraktionspuffer

   (z.B. 50 mg Stuhl+ 2450 µl Extraktionspuffer) ins Röhrchen geben und verschliessen.
5. Die Probe in einem Multi-Tube Vortex Mixer durch starkes Schütteln (höchste Geschwindigkeit) 30 Minuten extrahieren.
6. Das Homogenat in ein 2 mL Eppendorf Röhrchen überführen und für 5 Min bei 3'000 x g in einer Mikrozentrifuge zentrifugieren.
7. Den Überstand in ein frisches, angeschriebenes Röhrchen geben und den ELISA durchführen.

Extraktion unter Verwendung von Stuhlextraktionsbestecken

Die Extraktion ist beschrieben und illustriert in den Anleitungen, die den Extraktionsbestecken beiliegen.

1. CALEX® Cap Device (Code: B-CALEX-C50/B-CALEX-C200) : Die Extraktionsröhrchen sind mit 5 ml Extraktionspuffer gefüllt.

Wichtig: Nach der Extraktion werden die Extraktionsröhrchen 5 Minuten bei 500 x g zentrifugiert. Danach mit der Assaydurchführung fortfahren.

2. Fäkales Extraktionsbesteck (Code: 10745804322) oder BÜHLMANN Smart-Prep (Code: B-CAL-RD).
3. ScheBo® Quick-Prep™ (Code B-CAL-SO50): Die Extraktionsröhrchen sind vorgefüllt mit Extraktionspuffer.

Wichtig: Nach der Extraktion mit Smart-Prep oder ScheBo® Quick-Prep™ werden die Röhrchen 5 Minuten bei 3000 x g zentrifugiert. Alternativ wird das Homogenat in ein 2 mL Eppendorfgefäss überführt und 5 Minuten bei 3000 x g in einer Mikrofuge zentrifugiert. Den Überstand in ein frisches beschriftetes Röhrchen überführen und mit der Assaydurchführung fortfahren.

MESSBEREICHE

Der Test kann entweder nach der Anleitung für den unteren Konzentrationsbereich „Lower Range" ELISA Variante oder der Anleitung für den erweiterten Messbereich „Extended Range" ELISA Variante durchgeführt werden. Welche Version Sie wählen sollten, hängt von der erwarteten Calprotectin Konzentration der Proben ab. Für Proben bis zu 600 µg/g sollte die Anleitung Messbereichsverfahren 10 – 600 µg/g verwendet werden. Wenn die Konzentration der Proben jedoch häufig oberhalb von 600 µg/g liegt, raten wir zu dem erweiterten Messbereichsverfahren 30 – 1800 µg/g.

ASSAYDURCHFÜHRUNG

Wichtig:
Vor der Verwendung der Reagenzien müssen diese eine Temperatur von 18-28℃ aufweisen.
Nur die Stuhlextrakte verdünnen. Kalibratoren und Kontrollen sind gebrauchsfertig.

1. **PROBENVERDÜNNUNGSOPTIONEN**

MESSBEREICH 10 – 600 µg/g

1.1. **Manuelle Einwaage, Smart Prep oder ScheBo® Quick Prep™**: Die Stuhlextrakte mit Inkubationspuffer 1:50 verdünnen (z.B. 20 µL Extrakt + 980 µL Inkubationspuffer). Nach der Verdünnung gut mischen und, vor Gebrauch in Schritt 4c, die Proben für mindestens 5 Minuten bei 18-28℃ stehen lassen.

1.2. **CALEX® Cap Device:** Die Stuhlextrakte mit Inkubationspuffer 1:5 verdünnen (z.B. 100 µL Extrakt + 400 µL Inkubationspuffer). Nach der Verdünnung gut mischen und die Proben vor Gebrauch in Schritt 4c mindestens 5 Minuten bei 18-28℃ stehen lassen.

MESSBEREICH 30 – 1800 µg/g

The working range can be extended by a factor of 3, if you dilute the samples 1:7500 instead of 1:2500. This procedure is recommended, if high Calprotectin concentrations are to be expected. Precision and linearity of the assay allow for this extension of the measuring range.

1.1. **Manuelle Einwaage, Smart Prep oder ScheBo® Quick Prep™**: Die Stuhlextrakte mit Inkubationspuffer 1:150 verdünnen (z.B. 20 µL Extrakt + 2980 µL Inkubations-puffer). Nach der Verdünnung gut mischen und die Proben vor Gebrauch in Schritt 4c für mindestens 5 Minuten bei 18-28℃ stehen lassen.

1.2. **CALEX® Cap Device:** Die Stuhlextrakte mit Inkubationspuffer 1:15 (z.B. 50 µL Extrakt + 700 µL Inkubationspuffer) and mix well. Nach der Verdünnung gut mischen und die Proben vor Gebrauch in Schritt 4c für mindestens 5 Minuten bei 18-28℃ stehen lassen.

2. Eine Mikrotiterplatte mit ausreichenden Streifen für die Bestimmung von Kalibratoren, Kontrollen und verdünnten Proben bestücken. Ungebrauchte Streifen vom Halter entfernen und **unverzüglich** mit Trockenmittel einpacken und gekühlt lagern.
3. Kavitäten zweimal mit jeweils ≥300 µL Waschpuffer waschen. Waschpuffer ausschütten und Platte durch Ausschlagen auf saugfähigem Papier sorgfältig trocknen.

Wichtig: Eine **minimale Inkubationszeit des Waschpuffers** in der Kavität **von 20 Sekunden** muss bei allen drei Waschschritten eingehalten werden siehe technische Vorsichtsmassnahmen – ELISA).

4a. 100 µL Inkubationspuffer pipettieren (Blank) in die entsprechende Kavität pipettieren.

Je 100 µL Kalibrator A-E in die entsprechenden Kavitäten pipettieren.

4b. Je 100 µL Kontrolle Tief und Hoch in die entsprechenden Kavitäten pipettieren.

4c. Je 100 µL der verdünnten Proben in die nächsten Kavitäten pipettieren.

5. Mikrotiterplatte mit einer Folie abdecken und auf einem Mikrotiterplattenschüttler bei 450 rpm 30 + 5 Minuten bei 18-28℃ inkubieren (siehe technische Vorsichtsmassnahmen – ELISA).
6. Abdeckfolie entfernen, die Kavitäten entleeren und 3x mit jeweils ≥300 µL Waschpuffer waschen (siehe technische Vorsichtsmassnahmen – ELISA). Platte durch Ausschlagen auf saugfähigem Papier sorgfältig trocknen.
7. 100 µL Enzym-Marker zu allen Kavitäten zugeben.
8. Mikrotiterplatte mit einer Folie abdecken und auf einem Mikrotiterplattenschüttler bei 450 rpm 30 ± 5 Min bei 18-28℃ inkubieren.
9. Abdeckfolie entsorgen, die Kavitäten entleeren und **fünf mal** mit jeweils mindestens 300 µL Waschpuffer waschen. Platte durch Ausschlagen auf saugfähigem Papier sorgfältig trocknen.

Wichtig: TMB-Substratlösung vor dem Gebrauch auf 18-28℃ erwärmen.

10. 100 µL TMB-Substrat zu jeder Kavität zugeben.
11. Mikrotiterplatte zudecken und 15 ± 2 Min bei 18-28℃ auf einem Mikrotiterplattenschüttler bei 450 rpm inkubieren. Platte vor direktem Licht schützen.
12. 100 µL Stopp-Lösung zu jeder Mikroküvette zugeben und vorhandene Luftbläschen mit Pipettenspitzen entfernen. Innerhalb der nächsten 30 Min bei 450 nm messen.
13. Optische Dichte in einem Mikrotiter-Platten-Photometer bei 450 nm messen.

BERECHNUNG DER ERGEBNISSE

Messen Sie die Extinktion bei 450 nm in einem Mikrotiterplattenphotometer für Kalibratoren, Kontrollen und Proben unter Verwendung eines 4PL Auswertemodus und Blankabzug.

MESSBEREICH 10 – 600 µg/g

Wenn Sie die „Lower Range“ ELISA Variante verwenden, müssen die folgenden Kalibratorkonzentrationen in das ELISA Protokoll eingegeben werden: **10, 30, 100, 300 und 600 µg Calprotectin. Zusätzliche Verdünnungsfaktoren müssen mit den Ergebnissen multipliziert werden, um die Endergebnisse zu erhalten.**
In Table 19 und Figure 1 sind Beispiele für Ergebnisse und Standardkurve angegeben. *Diese Ergebnisse und die Standardkurve sind nur als Beispiel gedacht. Sie müssen für jeden Ansatz eine Standardkurve ansetzen.*

MESSBEREICH 30 – 1800 µg/g

Wenn Sie die „Extended Range“ ELISA Variante benutzen, müssen Sie die folgenden Kalibratorkonzentrationen in das ELISA Protokoll eingeben: **30, 90, 300, 900 und 1800 µg/g Calprotectin. Zusätzliche Verdünnungsfaktoren müssen mit den Ergebnissen multipliziert werden, um die Endergebnisse zu erhalten.**

In Table 24 und Figure 3 sind Beispiele für Ergebnisse und Standardkurve angegeben. *Diese Ergebnisse und die Standardkurve sind nur als Beispiel gedacht. Sie müssen für jeden Ansatz eine Standardkurve ansetzen.*

LEISTUNGSMERKMALE

Die Leistungsmerkmale wurden in Doppelbestimmung evaluiert.

MESSBEREICH 10 – 600 µg/g

Intra-Assay Precision: 4.7 %. Die Intra-Assay Präzision wurde bestimmt durch die 20-fache Doppelmessung von je drei extrahierten Stuhlproben im gleichen Ansatz, der entsprechend der Arbeitsanleitung durchgeführt wurde. Die Ergebnisse sind in Table 20 dargestellt.

Inter-Assay Precision: <15 %. Die Inter-Assay Präzision wurde bestimmt durch die Messung von 5 extrahierten Stuhlproben. Die Aliquots wurden getestet entsprechend der Testanleitung in 10 verschiedenen Läufen, durchgeführt von drei Laboranten, unter Verwendung von 2 Kit Lots in zwei Labors. Die Ergebnisse sind in Table 21 dargestellt.

Nachweisgrenze (LoB): <10 µg/g. Zwanzig Doppelmessungen mit Inkubations-Puffer wurden in einem Testansatz getestet. Mittelwert und Standardabweichung wurden für die Absorptionswerte ermittelt. Die kleinste Nachweisbare Menge wurde berechnet durch Interpolation vom Mittelwert plus zwei Standardabweichungen auf der erhaltenen Eichkurve und liegt klar unter dem Kalibrator A (10 µg/g).

Nachweisgrenze (LoQ): <10 µg/g. Zehn verschiedene Stuhlproben mit Werten zwischen 5.2 und 1254 µg/g Calprotectin wurden gleich wie in der Intra-Assay Präzision in Doppelansätzen 20-fach gemessen. Die Mittelwerte und die Variationskoeffizienten wurden für jede Probe berechnet. Das daraus entstandene Präzisionsprofil in Figure 2 zeigt, dass innerhalb des gesamten Standardbereichs (10-600 µg/g) ausreichend präzise gemessen werden kann.

Verdünnungslinearität: 103 %. Sieben Stuhlproben mit erhöhten Calprotectin Konzentrationen wurde gemäss der Arbeitsanleitung extrahiert. Die Extrakte wurden mit Inkubationspuffer verdünnt und gemäss der Arbeitsanleitung getestet. Die erhaltenen Werte sind in Table 22 dargestellt.

Wiederfindung: 100 %. Zwei extrahierte Stuhlproben wurden mit verdünntem Humanserum mit unterschiedlichen Konzentrationen an nativem Calprotectin versetzt. Die Proben wurden vor und nach Zugabe des verdünnten Serums entsprechend der Arbeitsanleitung gemessen. Die Resultate sind in
Table 23 angegeben.

Kreuzreaktivität: <0.1%. Inkubationspuffer wurde mit verschiedenen Konzentrationen von rekombinantem MRP8 oder MRP14 versetzt und entsprechend der Arbeitsanleitung gemessen. Die erhaltenen Werte sind in Table 28 dargestellt.

MESSBEREICH: 30 – 1800 µg/g

Intra-Assay Präzision: 4.0 %. Die Intra-Assay Präzision wurde entsprechend der Arbeitsanleitung bestimmt als Mittelwert von 20 Wertepaaren von 3 extrahierten Stuhlproben in einem Lauf. Die Ergebnisse sind in Table 25 dargestellt.

Inter-Assay Präzision: <15 %. Die Inter-Assay Präzision wurde bestimmt durch die Messung von 5 extrahierten Stuhlproben. Die Aliquots wurden getestet entsprechend der Testanleitung in 10 verschiedenen Läufen, durchgeführt von drei Laboranten, unter Verwendung von 2 Kit Lots in zwei Labors. Die Ergebnisse sind in Table 26 dargestellt.

Nachweisgrenze (LoQ): <30 µg/g. Achtzehn Stuhlproben mit Werten zwischen 10.8 and 2080 µg/g Calprotectin wurden 20mal in einem Assay bestimmt. Der % CV und der Mittelwert wurde für jede Probe bestimmt.. Als funktionelle Sensitivität die Calprotectinkonzentration bei 15% CV definiert. Das Präzisionsprofil erlaubt präzise Messungen über den gesamten Standardbereich von 30 bis 1800 µg/g. ie Ergebisse sind in Figure 4 dargestellt.

Verdünnunglinearität: 102 %. Fünf Stuhlproben mit erhöhten Calprotectin Konzentrationen wurden gemäss der Arbeitsanleitung extrahiert. Die Extrakte wurden mit Inkubationspuffer verdünnt, und gemäss der Arbeitsanleitung getestet. The erwarteten Werte wurden gemäss der beobachteten Werte der 1. Verdünnung berechnet. Die erhaltenen Werte sind in Table 27 dargestellt.

INTERPRETATION DER ERGEBNISSE

Die Bestimmung von Calprotectin aus Stuhlproben ist eine verläßliche und einfache Art organische von funktionellen gastrointestinalen Erkrankungen zu unterscheiden.

In einer klinischen Studie wurde von 401 Patienten, bei denen zuvor eine endoskopische Untersuchung durchgeführt wurde, Calprotectin im Stuhl untersucht. Die endoskopische Untersuchung zeigte bei 273 Patienten eine funktionelle Erkrankung, während bei 128 Patienten unterschiedliche organische Erkrankungen festgestellt wurden (Kolitis, Crohn's, Ulzera, Divertikulitis, Polypen, Adenome, Karzinome oder Infektionserkrankungen) (Ref. 12).

Die ROC Analyse (AUC: 0.935) ergab einen optimalen klinischen Cut off von 50 µg/g Calprotectin. Bei Anwendung dieses Grenzwertes kann eine klinische Spezifität von 84.4% und eine Sensitivität von 94.5% erreicht werden. (siehe Table 29).

Calprotectin Werte von Erwachsenen und Kindern zwischen 4 und 17 Jahren sind vergleichbar, während die Werte von Neugeborenen signifikant höher sind (Ref. 8).

Diese Daten stützen die folgenden Empfehlungen zur Beurteilung der Ergebnisse:

Normalwerte unter 50 µg/g:

Calprotectin Werte <50 µg/g schliessen eine Entzündung des gastrointestinalen Traktes weitgehend aus. Bei niedrigen Calprotectinwerten bedarf es in der Regel keiner invasiven Untersuchungen, um die Ursache der Erkrankung zu bestimmen (Ref. 12).

Erhöhte Werte zwischen 50 und 200 µg/g:

Calprotectin Werte zwischen 50 und 200 µg/g können durch eine milde Form der organischen Erkrankung wie z.B. eine durch NSAIDs verursachte Entzündung, eine milde Form der Divertikulitis und durch IBD in einer Remissionsphase verursacht werden. Da eine geringe Entzündungsaktivität vorhanden ist, empfehlen sich eine Wiederholungsmessung und weitere Untersuchungen.

Erhöhte Werte oberhalb von 200 µg/g:

Calprotectin Werte > 200 µg/g deuten auf eine aktive Form einer organischen Erkrankung des gastrointestinalen Traktes hin. Geeignete weitere Untersuchungen durch Gastroenterologen und therapeutische Massnahmen werden empfohlen.

Der für Erwachsene empfohlene Cut-off Wert von 50 µg/g kann auch für Kinder zwischen 4 und 17 Jahren verwendet werden, unabhängig von deren Geschlecht (Ref. 9).

QUALITÄTSKONTROLLE

Ein vollständiges Verständnis dieser Arbeitsanleitung ist für den erfolgreichen Einsatz des Produktes notwendig. Zuverlässige Resultate werden nur durch die Anwendung von GLP (aktuelle GLP Richtlinien) und die Einhaltung der Arbeitsanleitung erreicht.

Da es keine kommerziell erhältlichen Kontrollen für Calprotectin gibt, wird empfohlen, einen Pool von positiven Stuhlextrakten als interne Qualitätskontrolle mitzuführen.
Alle Kontrollen müssen im angegebenen Vertrauensbereich liegen. Die Vertrauensbereiche der Kontrollen sind Lot-spezifisch und sind auf dem Kit beiliegenden QC Datenblatt angegeben.
Falls die Ergebnisse des Testes nicht innerhalb der erwarteten Bereiche liegen und wiederholte Messungen einen Durchführungsfehler ausschliessen, sind folgende Punkte zu überprüfen: i) Pipetten, Thermometer und Uhren/Laborwecker, ii) Photometer Eichung, iii) Verfallsdaten der Reagenzien, iv) Lagerung- und Inkubations-Bedingungen, v) die TMB Substratlösung sollte farblos sein, vi) Wasserreinheit.

LEISTUNGSEINSCHRÄNKUNGEN

- Die Reagenzien, die mit diesem Kit geliefert werden sind für die Messung von humanem Calprotectin in extrahierten Stuhlproben optimiert.
- Die Ergebnisse sollten in Verbindung mit der Anamnese des Patienten und weiteren diagnostischen Tests verwendet werden.

FRANCAIS

DOMAINE D'UTILISATION

La trousse BÜHLMANN fCAL™ ELISA d a été conçue pour l'extraction et la détermination quantitative de calprotectine (MRP8/14 ; S100A8/S100A9) humaine dans les échantillons de selles (réf. 1-3).

PRINCIPE DU DOSAGE

Après une extraction rapide avec un volume de selles et 49 volumes de tampon d'extraction, ce dosage permet la mesure sélective de l'antigène calprotectine au moyen d'un ELISA de type „sandwich". Les puits de la microplaque sont recouverts d'un anticorps monoclonal de capture (Acm), anticorps hautement spécifique aux complexes hétérodimériques et polymériques de calprotectine (réf. 4-5). Les calibrateurs, les contrôles et les extraits de selles sont incubés pendant 30 minutes à température ambiante. Après une étape de lavage, le second anticorps (Ac) conjugué à la péroxydase de raifort (HRP) se fixe à la molécule de calprotectine liée à l'Acm. Après une incubation et un lavage, le substrat TMB (tétraméthylbenzidine) est ajouté aux puits. La réaction enzymatique permet d'obtenir une coloration bleue. Elle est stoppée par l'ajout d'une solution acide (H_2SO_4). La couleur bleue vire au jaune. La mesure de l'absorbance à 450 nm est directement proportionnelle à la concentration de calprotectine.

REACTIFS FOURNIS ET PREPARATION

Réactifs	EK-CAL	EK-CAL2	Code	Reconstitution
	Quantité			
Tampon d'extraction	3 flacons de 125 mL	6 flacons de 125 mL	B-CAL-EX	Prêt à l'emploi
Microplaque Coatée avec un Acm anti-Calprotectine	8 x 12 puits	2 x 8 x 12 puits	B-CAL-MP	Prête à l'emploi
Films adhésifs	3 pièces	6 pièces		
Tampon de lavage concentré 10x Avec conservateurs	1 flacon de 100 mL	2 flacons de 100 mL	B-CAL-WB	A reconstituer avec 900 mL d'eau déionisée (chacun)
Tampon d'incubation Avec conservateurs	2 flacons de 125 mL	3 flacons de 125 mL	B-CAL -IB	Prêt à l'emploi
Calibrateurs A-E[1) 2)] Calprotectine dans un tampon protéique avec conservateurs	5 flacons de 1 mL	5 flacons de 1 mL	B-CAL-CASET	Prêts à l'emploi
Contrôles bas et élevé [3)] Sérum humain avec conservateurs	2 flacons de 1 mL	2 flacons de 1 mL	B-CAL-CONSET	Prêts à l'emploi
Marqueur enzymatique Ac anti-Calprotectine conjugué à la HRP	1 flacon de 12 mL	2 flacons de 12 mL	B-CAL-EL	Prêt à l'emploi
Substrat TMB Solution de TMB dans un tampon citrate	1 flacon de 12 mL	2 flacons de 12 mL	B-TMB12	Prêt à l'emploi
Solution stop 0.25 M H_2SO_4	1 flacon de 12 mL	2 flacons de 12 mL	B-STS12	Prête à l'emploi **corrosif**

Table 7

[1] Les concentrations actuelles de calprotectine des calibrateurs A à E sont respectivement : 4, 12, 40, 120 et 240 ng/mL. Après extraction et dilution de l'échantillon, une dilution à 1:2500 est prise en compte pour la détermination des calibrateurs A à E. Les concentrations suivantes doivent être utilisées pour la gamme basse de dosage ELISA : 10, 30, 100, 300 and 600 µg/g de calprotectine fécale.

[2] Pour la procédure ELISA étendue utilisez les concentrations de calibrateurs A à E suivantes dans le mode opératoire du lecteur de microplaques correspondant : **30, 90, 300, 900 et 1800 µg/g de Calprotectine**.

[3] Les concentrations en Calprotectine humaine native des contrôles varient en fonction des lots. Veuillez-vous référer à la fiche de contrôle qualité pour les concentrations effectives.

STOCKAGE ET PEREMPTION DES REACTIFS

Réactifs non ouverts/ non entamés	
Stables à 2-8°C. Ne pas utiliser au-delà de la date de péremption figurant sur les étiquettes.	
Réactifs ouverts/ reconstitués	
Tampon d'extraction	Stables à 2-8°C jusqu'à la date de péremption
Microplaque	Replacer immédiatement les barrettes non utilisées dans la pochette contenant le dessiccateur puis la refermer soigneusement. Stable à 2-8°C jusqu'à la date de péremption.
Tampon de lavage	Stable à 2-8°C pendant 6 mois après dilution
Tampon d'incubation	Stables à 2-8°C jusqu'à la date de péremption
Calibrateurs	
Contrôles	
Marqueur enzymatique	
Substrat TMB	
Solution stop	

Table 8

REACTIFS FOURNIS SELON LA DEMANDE

Tubes d'extraction de selles

CALEX® Cap	Unités à 50 ou 200 dispositifs ré-remplis avec 5 mL de tampon d'extraction / prêts à l'emploi	B-CALEX-C50 B-CALEX-C200
Smart-Prep	50 tubes, spatules et fonds de tube	B-CAL-RD
Schebo® Quick-Prep™	50 tubes comprenant chacun cône & embout du doseur, pré-remplis avec 1.3 mL de tampon d'extraction / prêts à l'emploi	B-CAL-SO50

Table 9

MATERIEL REQUIS MAIS NON FOURNI

Procédure d'extraction

- Anses d'inoculation jetables de 10 µl
- Tubes de 15 mL en polypropylène avec bouchons à visser pour la procédure d'extraction standard ou tubes d'extraction (voir ci-dessus).
- Hotte à flux laminaire
- Agitateur Multi- tubes ou vortex
- Balance de précision (10-150 mg)
- Micro centrifugeuse (≥3000 x g)
- Centrifugeuse (≥500 x g)

Procédure de l' ELISA

- Pipettes de précision réglables avec pointes jetables pour 10, 100 et 1000 µL.
- Tubes jetables en polypropylène ou polystyrène pour la préparation des dilutions d'échantillons.
- Eprouvette graduée de 1000 mL pour la préparation du tampon de lavage.
- Laveur automatique de microplaques ou une pissette pour le tampon de lavage (voir PRÉCAUTIONS TECHNIQUES).
- Papier absorbant.
- Agitateur de microplaques (voir PRÉCAUTIONS TECHNIQUES).
- Lecteur de microplaques pour la mesure de l'absorbance à 450 nm.

PRECAUTIONS

PRÉCAUTIONS DE SÉCURITÉ

- Matériel d'origine humaine : Les barrettes de la microplaque, les calibrateurs et les contrôles de cette trousse contiennent des composants d'origine humaine. Bien que les tests de détection de l'antigène de surface du VHB et des anticorps des virus VHC et VIH1/2 se soient révélés négatifs, il convient de considérer les réactifs comme capables de transmettre des maladies infectieuses, et de les manipuler conformément aux bonnes pratiques de laboratoire (GLP/BPL), en prenant les précautions appropriées.
- **Substrat et Solution Stop** : Le Substrat (B-TMB12) contient du tétraméthylbenzidine, et du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2). La Solution stop (B-STS12) contient de l'acide sulfurique. Ces substances irritent les yeux, la peau ainsi que les muqueuses. Eviter par conséquent tout contact avec les yeux, la peau et les vêtements. En cas de contact accidentel avec les yeux ou la peau, rincer impérativement à grande eau.
- Pour en savoir plus sur les précautions pour la manipulation et l'élimination des déchets, nous vous recommandons fortement de consulter l'organisme réglementaire compétent pour votre pays.

PRÉCAUTIONS TECHNIQUES

Réactifs

- **Les puits de la microplaque** peuvent être recouverts de **résidus** formés lors du processus de production. Ils sont éliminés par le lavage (voir l'étape 3 de la procédure) et n'ont aucune influence sur les résultats.
- Lire attentivement les instructions avant de réaliser le test. Le test ne donnera pas les résultats escomptés en cas de dilution incorrecte ou de modification des réactifs, ou de stockage dans des conditions autres que celles détaillées dans le présent mode d'emploi.
- Les composants ne doivent pas être utilisés au-delà de la date d'expiration imprimée sur les étiquettes.
- Ne pas mélanger des réactifs de lots différents.
- Il convient de prendre toutes les précautions requises pour empêcher toute contamination croisée entre réactifs, entre échantillons ou entre puits.
- Laisser les réactifs s'équilibrer à température ambiante. Reconstituer les réactifs lyophilisés comme indiqué. Bien mélanger (au vortex) les réactifs avant utilisation.
- Les puits de la microplaque sont à usage unique.

Extraction

- Dans le but d'obtenir des résultats quantitatifs, il est important d'homogénéiser l'intégralité des selles pesées dans le tampon d'extraction. Il convient également d'éviter de contaminer le bouchon du tube. Les substances non dissoutes (non digérées) peuvent persister dans les tubes après l'extraction.

Procedure de l' ELISA

- Le lavage est un point important de l'ELISA. Pour garantir la reproductibilité des résultats il est nécessaire que le tampon de lavage incube à chaque fois au minimum 20 secondes dans les puits de la plaque.
- Les laboratoires BÜHLMANN recommandent, lors de l'utilisation d'un laveur de plaque automatique, le choix du mode "Plaque" avec lequel chaque étape

(remplissage/aspiration) est effectuée sur toute la plaque avant de passer à l'étape suivante. De cette façon le temps d'incubation minimum est garanti.

- Il est obligatoire de respecter le nombre de cycles de lavage pour l'obtention de résultats fiables.
- **L'agitateur de plaque** doit être réglé à 450 rpm (<10 Hz). Une fréquence de rotation supérieure peut avoir pour conséquence une faible linéarité de dilution pour les valeurs comprises entre 300/900 et 600/1800 µg/g. Le mode orbital est préférable au mode réciproque.
- Le temps d'incubation de l'étape 5 ne doit pas être inférieur à 30 minutes pour assurer l'interaction complète entre l'antigène et l'anticorps. Des temps d'incubation un peu plus longs (jusqu'à 5 minutes) n'ont pas d'influence sur le résultat final.
- L'enzyme (HRP) utilisée comme marqueur est inactivée par l'oxygène et est hautement sensible à l'azoture de sodium, au thimérosal, à l'acide hypochloreux, ainsi qu'aux hydrocarbures chlorés couramment rencontrés dans l'eau. N'utiliser par conséquent que de l'eau déionisée ou distillée de bonne qualité.
- Comme les conditions varient d'essai à essai, une courbe d'étalonnage doit être établie pour chaque nouveau dosage. L'alignement vertical est recommandé.
- Si la concentration initiale d'un échantillon présente un signal plus élevé que celui du calibrateur le plus haut, l'échantillon doit être dilué à l'aide du tampon d'incubation et dosé à nouveau selon la procédure standard. Le facteur de dilution doit être pris en compte pour le calcul de la concentration effective. Les cycles de congélation/ décongélation répétés des échantillons et des réactifs doivent être évités.

PRELEVEMENT ET CONSERVATION DES ECHANTILLONS

La mise en œuvre de la procédure nécessite 50 à 100 mg d'échantillon natif de selles pour chaque extraction.
Le prélèvement de selles se fait dans des tubes ordinaires. Elles se conservent au réfrigérateur à 2-8°C au moi ns 6 jours.
Les extraits sont stables pendant au moins 7 jours à 2-8°C et au moins 24 mois à -20ºC.
Important : Les échantillons doivent être prélevés sans additifs.

STANDARDISATION

La trousse BÜHLMANN fCAL™ ELISA est calibrée avec la MRP8/14 purifiée de granulocytes humains.

EXTRACTION

Procédure d'extraction standard

1. Marquer et peser les tubes en polypropylène avec l'anse d'inoculation jetable.
2. Prélever 50 à 100 mg d'échantillon de selles décongelées au moyen de l'anse d'inoculation et transférer l'anse dans le tube pré-pesé.
3. Déterminer la quantité nette d'échantillon, casser l'anse et laisser sa partie inférieure dans le tube.
4. Ajouter le tampon d'extraction selon la formule

   x mg de selles **x 49 =** y µl de tampon d'extraction

   (par ex.. 50 mg de selles + 2450 µl tampón d'extraction) dans le tube et le fermer.
5. Homogénéiser l'échantillon à l'aide d'un agitateur multi-tubes pendant 30 minutes à vitesse maximale. Si on utilise le tube d'extraction de selles Roche, l'extraction peut être réduite à 1 minute à l'aide d'un vortex.
6. Transférer l'extrait obtenu dans un tube Eppendorf de 2 mL puis centrifuger dans une micro centrifugeuse durant 5 minutes à 3000 x g.
7. Récupérer le surnageant dans un nouveau tube préalablement identifié et poursuivre avec la procédure ELISA.

Procédure d'extraction à l'aide des tubes d'extraction de selles.

L'extraction est décrite et illustrée dans le manuel d'utilisation fourni avec les tubes d'extraction respectifs.

1. Tube d'extraction **CALEX® Cap** (réf. : B-CALEX-C50/ B-CALEX-C200) : les tubes d'extraction sont pré-remplis avec le tampon d'extraction.

Important : Après extraction, centrifuger les tubes CALEX® Cap 5 minutes à 500 x g et poursuivre avec la procédure ELISA.

2. Tubes d'extraction de selles BÜHLMANN **Smart-Prep** (réf. : B-CAL-RD) .

3. ScheBo® Quick-Prep™ (réf. : B-CAL-SO50) : les tubes d'extraction sont pré-remplis avec le tampon d'extraction.

Important : Après extraction avec Smart-Prep ou ScheBo® Quick-Prep™ centrifuger les tubes 5 minutes à 3000 x g. L'extrait peut aussi être transféré dans un tube Eppendorf de 2 mL et centrifugé à l'aide d'une micro-centrifugeuse pendant 5 minutes à 3000 x g. Récupérer le surnageant dans un nouveau tube préalablement identifié et poursuivre avec la procédure ELISA.

GAMME DE DOSAGE ELISA

Le dosage peut être mis en œuvre selon la procédure ELISA standard ou étendue. Le choix dépend de la concentration en Calprotectine des échantillons. Pour les échantillons dont la concentration ne dépasse pas 600 µg/g, suivez la procédure ELISA standard (10 - 600 µg/g).

Si la concentration des échantillons tend à dépasser 600 µg/g, suivez la procédure ELISA étendue (30 -1800 µg/g).

PROCÉDURE ELISA

Important : Les réactifs doivent être équilibrés à température ambiante (18-28°C) avant utilisation. S euls les échantillons de selles doivent être diluées. Calibrateurs et contrôles sont prêts à l'emploi.

1. **METHODES DE DILUTION DE L'ECHANTILLON DE SELLES**

GAMME DE DOSAGE 10 – 600 µg/g

1.1. **Procédure de pesée manuelle, Smart Prep ou ScheBo® Quick Prep™**: diluer les surnageants au 1/50ème avec du tampon d'incubation (par exemple : 20 µL d'extrait et 980 µL de tampon d'incubation) et bien homogénéiser. Laisser les échantillons sédimenter pendant au moins 5 min à température ambiante (18-28°C) avant de réaliser l'étape 4c.

1.2. **Dispositif CALEX® Cap** : diluer les surnageants au 1/5ème avec du tampon d'incubation (par exemple : 100 µL d'extrait et 400 µL de tampon d'incubation) et bien homogénéiser. Laisser les échantillons sédimenter pendant au moins 5 minutes à température ambiante (18-28°C) avant de réaliser l'étape 4c.

GAMME DE DOSAGE 30-1800 / µg/g

La gamme de dosage peut être étendue d'un facteur 3, si les échantillons sont dilués au 1/7500ème au lieu de 1/2500ème. Cette procédure est recommandée lorsque des valeurs élevées de calprotectine fécale sont attendues. La précision et la linéarité du test permettent l'extension de la gamme de dosage.

1.1. **Procédure de pesée manuelle, Smart-Prep ou ScheBo® Quick Prep™** : diluer les surnageants au 1/150ème avec du tampon d'incubation (par exemple : 20 µL d'extrait et 2980 µL de tampon d'incubation) et bien homogénéiser. Laisser les échantillons sédimenter pendant au moins 5 min à température ambiante (18-28°C) avant de réaliser l'étape 4c

1.2. **Dispositif CALEX® Cap** : diluer les surnageants au 1/15ème avec du tampon d'incubation (par exemple : 50 µL d'extrait et 700 µL de tampon d'incubation) et bien homogénéiser. Laisser les échantillons sédimenter pendant au moins 5 min à température ambiante (18-28°C) avant de réaliser avant de réali ser l'étape 4c

2. Préparer une microplaque avec suffisamment de puits pour recevoir tous les calibrateurs, contrôles et échantillons dilués. Retirer les barrettes en surplus du support et les placer immédiatement au froid dans la pochette prévue à cet effet et contenant le dessiccateur.

3. Laver deux fois chaque puits avec au moins 300 µL de tampon de lavage. Vider les puits et taper énergiquement la microplaque sur du papier absorbant.

Important : le tampon de lavage doit **incuber un minimum de 20 secondes** dans les **p**uits et ceci pour chacune des trois étapes de lavage (se référer aux PRÉCAUTIONS TECHNIQUES, procédure de l'ELISA)

4a. Distribuer 100 µL de tampon d'incubation (blanc) dans le puits respectif.

Distribuer 100 µL de calibrateur A-E dans les puits respectifs.

4b. Distribuer 100 µL de contrôles bas et élevé dans les puits respectifs.

4c. Distribuer 100 µL de chaque échantillon dilué dans les puits suivants.

5. Couvrir la microplaque à l'aide d'un des films adhésifs fournis et incuber à 18-28°C pendant 30 ± 5 min sur un agitateur de microplaque réglé à 450 rpm (se référer aux PRÉCAUTIONS TECHNIQUES, procédure de l'ELISA).

6. Retirer et jeter le film adhésif. Vider puis laver chaque puits trois fois, avec au moins 300 µL de tampon de lavage (se référer aux PRÉCAUTIONS TECHNIQUES, procédure de l'ELISA). Vider les puits et les sécher en tapant énergiquement la microplaque sur du papier absorbant.

7. Ajouter 100 µL de marqueur enzymatique dans tous les puits.

8. Recouvrir la microplaque d'un nouveau film adhésif et incuber à 18-28°C durant 30 ± 5 min sur un agitateu r de microplaques réglé à 450 rpm.

9. Retirer et jeter le film adhésif. Vider puis laver les puits **cinq fois** avec au moins 300 µL de tampon de lavage. Vider les puits et les sécher en tapant énergiquement la microplaque sur du papier absorbant.

Important : laisser le substrat TMB s'équilibrer à une température de 18-28°C.

10. Ajouter 100 µL de substrat TMB dans chaque puits.

11. Recouvrir la microplaque d'un nouveau film adhésif et incuber sur l'agitateur à 450 rpm pendant 15 ± 2 min à 18-28°C. Protéger la microplaque de la lumière directe.

12. Ajouter 100 µL de solution stop acide dans chaque puits. Eliminer les bulles d'air à l'aide d'une pointe de pipette puis passer à l'étape 13 au cours des 30 min suivantes.

13. Lire l'absorbance à 450 nm à l'aide d'un lecteur de microplaques.

CALCUL DES RESULTATS

Lire l'absorbance à 450nm à l'aide d'un lecteur de plaque, pour chaque calibrateur, contrôle et échantillon. Utiliser un modèle de régression logistique à 4 paramètres en soustrayant le blanc et calculer les concentrations en calprotectine fécale des échantillons**.**

GAMME DE DOSAGE 10 - 600 µg/g

Si vous optez pour la procédure domaine de valeurs basses, utilisez les concentrations de calibrateurs suivantes dans le mode du lecteur de microplaques correspondant : **10, 30, 100, 300, 600 µg/g. Les résultats doivent être multipliés par le ou les éventuels facteurs de dilution supplémentaires pour obtenir les résultats finaux.**

Des exemples caractéristiques de données sont reportés dans la Table 19 (résultats) et la Figure 1 (courbe d'étalonnage). *Ces résultats et cette courbe d'étalonnage ne sont fournis qu'à titre d'exemple. Tracez une courbe d'étalonnage pour chaque nouveau set d'échantillons à doser.*

GAMME DE DOSAGE 30 - 1800 µg/g

Si vous optez pour la procédure plage de mesure étendue utilisez les concentrations de calibrateurs suivantes dans le mode du lecteur de microplaques correspondant : **30, 90, 300, 900 et 1800 µg/g. Les résultats doivent être multipliés par le ou les éventuels facteurs de dilution supplémentaires pour obtenir les résultats finaux.**

Des exemples caractéristiques de données sont reportés dans la Table 24 (résultats) et la Figure 3 (courbe d'étalonnage). *Ces résultats et cette courbe d'étalonnage ne sont fournis qu'à titre d'exemple. Tracez une courbe d'étalonnage pour chaque nouveau set d'échantillons à doser.*

CARACTERISTIQUES DE PERFORMANCE

Les caractéristiques de performances de l'essai ont été validées sur des échantillons testés en double.

GAMME DE DOSAGE 10 - 600 µg/g

Précision intra-essai : 4.7%. Elle est obtenue à partir des résultats de 20 duplicatas de valeurs de 3 extraits de selles, au cours d'un même essai. Les données sont répertoriées dans la Table 20.

Inter-essai : <15 %. La précision moyenne entre dosages 'ELISA est calculée sur 5 extraits de selles. Les prélèvements sont testés selon la procédure de dosage en 10 analyses distinctes, par trois techniciens, en utilisant deux lots de kit dans deux laboratoires différents. Les valeurs sont répertoriées dans la Table 21.

Limite de blanc (LoB) : <10 µg/g. 20 duplicatas de tampon d'incubation furent analysés au cours d'un même essai. La valeur moyenne et la déviation standard furent calculées pour chaque absorbance obtenue. La plus petite concentration détectable de Calprotectine, clairement inférieure au Calibrateur A (10 µg/g) fut définie en ajoutant 2 déviations standard à l'absorbance moyenne et en reportant la valeur obtenue sur la courbe d'étalonnage générée lors d'un nouvel essai.

Limite de quantification (LoQ) : <10 µg/g. 10 échantillons différents de selles présentant des concentrations de Calprotectine comprises entre 5.2 et 1254 µg/g furent analysés 20 fois en double en intra-essai. Le % de CV et les valeurs moyennes furent calculées pour chaque échantillon. La LoQ observée est de l'ordre de 15 % de CV. Le profil de précision résultant (Figure 1) permet une mesure précise dans la gamme standard entière de 10 à 600 µg/g).

Linéarité de la dilution : 103 %. 7 échantillons de selles présentant des valeurs de Calprotectine élevés furent extraits selon la procédure usuelle. Les extraits furent dilués avec du tampon d'incubation puis analysés selon le protocole standard. Les valeurs attendues furent calculées à partir des résultats obtenus lors de la première dilution. Elles sont présentées dans la Table 22.

Test de récupération : 100 %. 2 extraits de selles furent additionnés de différentes concentrations de Calprotectine native diluée contenant du sérum humain. Les échantillons furent analysés selon la procédure standard avant, puis après l'addition de Calprotectine. Les données obtenues sont présentées dans la
Table 23.

Réactions croisées : <0.1 %. Le tampon d'incubation fut additionné respectivement de différentes concentrations des 2 monomères recombinant MRP8 et MRP14 puis analysé selon la procédure standard. Les données obtenues sont présentées dans la Table 28.

CARACTERISTIQUES DE PERFORMANCE

Les caractéristiques de performances de l'essai ont été validées sur des échantillons testés en double.

GAMME DE DOSAGE 30 - 1800 µg/g

Précision intra-essai : 4,0 %. La précision intra-dosage moyenne est calculée à partir des résultats de 20 duplicatas de valeur provenant de trois extraits de selles dosés au cours d'une analyse unique, selon la procédure de dosage. Les valeurs sont répertoriées dans la Table 25.

Précision inter-essai : < 15 %. La précision moyenne entre dosages ELISA est calculée sur 5 extraits de selles. Les prélèvements sont testés selon la procédure de dosage en 10 analyses distinctes, par trois techniciens, en utilisant deux lots de kit dans deux laboratoires différents. Les valeurs sont répertoriées dans la Table 26.

Limite de quantification (LoQ) : < 30 µg/g. 18 échantillons de selles de concentrations en Calprotectine comprises entre 10.8 et 2080 µg/g sont analysés 20 fois en double au cours d'un dosage unique. Le CV en % et la moyenne sont calculés pour chaque échantillon. La LoQ est calculée comme étant la concentration de Calprotectine à un CV de 15 %. Le profil de précision obtenu démontre que les mesures sont précises dans toute la plage d'étalonnage entre 30 et 1800 µg/g. Les résultats sont représentés sur la Figure 4.

Linéarité de la dilution : 102 %. Cinq échantillons de selles de concentration en Calprotectine supérieure à la normale sont prélevés selon la procédure de dosage. Les extraits sont dilués dans le tampon d'incubation avant d'être dosés selon la procédure de dosage. Les valeurs attendues sont calculées à partir de la valeur observée déterminée à la première dilution. Les résultats sont répertoriés dans la Table 27.

INTERPRETATION DES RESULTATS

La méthode d'estimation de Calprotectine dans les selles est fiable et facile à utiliser pour différencier les maladies gastro-intestinales organiques des maladies gastro-intestinales fonctionnelles.

Dans une étude clinique, 401 patients symptomatiques, programmés pour une coloscopie, ont été examinés. L'examen endoscopique a montré que 273 patients présentent des maladies fonctionnelles alors que 128 patients présentent des maladies organiques diverses (colites, maladie de Crohn, ulcères, diverticules, polypes, adénomes, cancer, ou maladies infectieuses) (réf. 12).

L'analyse de la courbe ROC (AUC : 0.935) montre une valeur seuil clinique optimale à 50 µg/g. En appliquant cette valeur seuil, une sensibilité clinique et une spécificité, respectivement, de 84.4% et 94.5%, ont été atteintes dans la différenciation des maladies organiques et fonctionnelles (voir Table 29).

La concentration de Calprotectine dans les selles est comparable chez les adultes et les enfants, tandis qu'elle peut augmenter de façon significative chez les nouveau-nés (réf. 8).

Ces données confortent les recommandations suivantes pour l'interprétation des résultats :

Valeurs normales inférieures à 50 µg/g :

Des valeurs de Calprotectine <50 µg/g excluent une inflammation au niveau du tractus gastro-intestinal. Les patients ayant une faible concentration de Calprotectine fécale ne nécessitent donc pas d'intervention invasive pour déterminer la cause de l'inflammation (réf. 12).

Valeurs élevées entre 50 et 200 µg/g :

Des valeurs de Calprotectine entre 50 et 200 µg/g peuvent avoir pour origine une maladie organique telle qu'une inflammation causée par les AINS, une diverticulite non sévère ou un syndrôme de l'intestin irritable en phase de rémission. En présence d'une inflammation de faible intensité il est recommandé de répéter la mesure et de réaliser des tests complémentaires.

Valeurs élevées supérieures à 200 µg/g :

Des valeurs de Calprotectine >200 µg/g indiquent une maladie de type organique active avec inflammation du tractus gastro-intestinal. Il est suggéré de réaliser des examens complémentaires et de mettre en place un traitement curatif sous le suivi de médecins spécialistes.

La valeur seuil proposée pour les adultes (50 µg/g) peut également être utilisée comme référence chez les enfants âgés de 4 à 17 ans, quel que soit le sexe (réf. 9).

CONTROLE QUALITE

Une lecture exhaustive de ce manuel est recommandée pour l'utilisation correcte du produit. Des résultats fiables ne seront obtenus que par un travail en laboratoire précis (bonnes pratiques de laboratoire usuelles) et en suivant fidèlement les recommandations de cette brochure.

Comme il n'existe pas de contrôle pour la calprotectine commercialement disponible, nous recommandons

l'utilisation d'un pool d'extraits positifs et négatifs comme référence interne et contrôle qualité.
La reproductibilité des paramètres de la courbe d'étalonnage et des valeurs des contrôles devrait être comprise dans le domaine des valeurs attendues établies par chaque laboratoire.
Si la précision des mesures ne correspond pas aux limites établies et que les répétitions excluent toute erreur technique, il est recommandé de contrôler les paramètres suivants: i) pipetage, appareils de mesure de température et de temps, ii) calibration des instruments, iii) date de péremption des réactifs, iv) conditions de stockage et d'incubation, v) le substrat TMB devrait être incolore, vi) pureté de l'eau.

LIMITES

- Les réactifs fournis dans ce coffret sont optimisés pour le dosage de Calprotectine dans les échantillons de selles.
- Les résultats du test doivent être interprétés en tenant compte des informations résultant de l'examen clinique du patient et d'autres procédures diagnostiques.

ITALIANO

USO

Il Kit BÜHLMANN fCAL™ ELISA è inteso per l'estrazione e la determinazione quantitativa della Calprotectina umana (MRP8/14; S100A8/S100A9) nei campioni di feci (ref. 1-3).

PRINCIPIO DEL DOSAGGIO

Il test consente la misurazione selettiva dell'antigene Calprotectina attraverso un saggio ELISA. Un anticorpo monoclonale a cattura (mAb) altamente specifico rispettivamente per i complessi eterodimerici e dimerici di Calprotectina (ref. 4-5), è coattato alla micropiastra. Calibratori, controlli ed estratti del paziente sono incubati per 30 min. a temperatura ambiente. Dopo una fase di lavaggio un secondo anticorpo (Ab) coniugato con perossidasici di rafano (HRP) rileva le molecole di Calprotectina legate all'anticorpo monoclonale coattato alla piastra. Dopo incubazione ed ulteriore lavaggio, viene aggiunto il substrato tetrametilbenzidina (TMB) con formazione di colore blu, seguito dall'aggiunta di soluzione di stop (virata del colore al giallo). L'assorbanza viene misurata a 450 nm.

REAGENTI FORNITI E LORO PREPARAZIONE

Reagenti	EK-CAL	EK-CAL2	Codice	Ricostituzione
	Quantità			
Tampone per estrazione	3 flaconi da125 mL	6 flaconi da125 ml	B-CAL-EX	Pronto all'uso
Micropiastra Precoattata con anti-calprotecina mAb	Pozzetti da 12 x 8	Pozzetti da 2 x 12 x 8	B-CAL-MP	Pronto all'uso
Foglio Sigillante per la piastra	3 fogli	6 fogli		
Tampone di Lavaggio Concentrato (10x) Con conservanti	1 flacone da 100 mL	2 flaconi da 100 mL	B-CAL-WB	Diluire ciascuno con 900 ml di acqua deionizzata
Tampone di Incubazione Con conservanti	2 flaconi da 125 mL	3 flaconi da 125 mL	B-CAL-IB	Pronto all'uso
Calibratori dalla A-E[1) 2] Calprotecina in una matrice tampone con conservanti	5 provette da 1 mL	5 provetteda 1 mL	B-CAL-CASET	Pronto all'uso
Controllo Basso / Alto [3)] Matrice di siero umano con conservanti	2 provette da 1 mL	2 provette da 1 mL	B-CAL-CONSET	Pronto all'uso
Marcatore Enzimatico Anti-Calprotectina Ab coniugato con HRP	1 provetta da 12 mL	2 provette da 12 mL	B-CAL-EL	Pronto all'uso
Substrato TMB TMB in un tampone citrato	1 provetta da 12 mL	2 provette da 12 mL	B-TMB12	Pronto all'uso
Soluzione di Stop Acido Solforico 0.25 M	1 provetta da 12 mL	2 provette da 12 mL	B-STS12	Pronto all'uso **Agente corrosivo**

Table 10

[1)] La concentrazione effettiva degli standards da A ad E è rispettivamente di 4, 12, 40, 120 e 240 ng/ml di Calprotectina. Per l'estrazione e la successiva diluizione del campione è stata presa in considerazione una diluizione di 1:2500 per l'assegnazione dei calibratori da A ad E.
Le seguenti concentrazioni di Calprotectina devono essere utilizzate per la procedura ELISA a basso range: **10, 30, 100, 300 e 600 µg/g di Calprotectina.**

[2] Se invece si utilizza la procedura ELISA a range esteso si dovranno utilizzare le seguenti concentrazioni: **30, 90, 300, 900 e 1800 µg/g di Calprotectina.**

[3] I controlli contengono quantità lotto specifiche di Calprotectina umana. Per le concentrazioni effettive far riferimento al foglio aggiuntivo QC.

CONSERVAZIONE E DURATA

Reagenti sigillati	
Conservare a 2-8°C. Non utilizzare oltre la data di scadenza stampata sulle etichette.	
Reagenti aperti / ricostituiti	
Tampone per estrazione	Conservare a 2-8°C fino alla data di scadenza
Micropiastra	Riporre immediatamente le strip non utilizzate nella busta di alluminio che contiene l'essiccante e risigillarle. Conservarle fino a 2 mesi a 2-8°C.
Tampone di Lavaggio Diluito	Conservare fino a 6 mesi a 2-8°C.
Tampone di Incubazione	Conservare a 2-8°C fino alla data di scadenza.
Calibratori	
Controlli	
Marcatore Enzimatico	
Substrato-TMB	
Soluzione di Stop	

Table 11

REAGENTI FORNITI SU RICHIESTA

Dispositivi di *estrazione* delle feci

Dispositivi CALEX® Cap	Unità da 50 o 200 dispositivi, ciascuno riempito con tampone di estrazione ; 5 mL / pronto all' uso	B-CALEX-C50 B-CALEX-C200
Smart-Prep	50 dispositivi, spatole e camere di raccolta feci	B-CAL-RD
ScheBo® Quick-Prep™	50 dispositivi costituiti da provetta, cono & tappo dosatore, 1.3 mL, Pronto all' uso	B-CAL-SOFI

Table 12

MATERIALI RICHIESTI MA NON FORNITI

Procedura di estrazione

- Anse per inoculazione da 10 µL
- Provette di polipropilene con tappi a vite da 15 mL necessarie per procedura di estrazione standard; dispositivi di estrazione (vedi sopra).
- Cappa a flusso laminare
- Vortex per provette
- Bilancia di Precisione (10-150 mg)
- Microcentrifuga (≥3000 x g)
- Centrifuga (≥500 x g)

Procedura del dosaggio ELISA

- Pipette di precisione da 10 µL, 100 µL e 1000 µL con puntali monouso.
- Provette monouso di polistirene o polipropilene, per la preparazione delle diluizioni dei campioni.
- Cilindro da 1000 mL per la diluizione del Tampone di Lavaggio Concentrato.
- Lavatore per micropiastra o erogatore a spruzzo per il Tampone di Lavaggio (vedi Avvertenze Procedurali).
- Rotatore per micropiastra (vedi Avvertenze Procedurali)
- Carta da blotting
- Lettore per micropiastra per la misurazione dell'assorbanza a 450 nm.

PRECAUZIONI

PRECAUZIONI DI SICUREZZA

- Le strip, i Calibratori e i Controlli di questo kit contengono componenti di origine umana. Benché testati e risultati negativi all'antigene di superficie HBV e agli anticorpi HCV e HIV1/2, i reagenti devono essere maneggiati come potenzialmente infettivi e secondo le buone pratiche di laboratorio (GLP) utilizzando le dovute precauzioni.
- **Substrato e soluzione di stop:** Il substrato di TMB (B-TMB12) contiene tetrametilbenzidina, e perossido di idrogeno (H_2O_2). La soluzione di stop (B-STS12) contiene acido solforico (0.25 M). Ciascuno di questi reagenti è irritante per gli occhi, la pelle e le mucose. Evitare il contatto con occhi, pelle e vestiario. Se viene a contatto con gli occhi, la pelle e gli indumenti lavarsi immediatamente con molta acqua. Se viene a contatto con gli occhi, la pelle e gli indumenti lavarsi immediatamente con molta acqua.

PRECAUZIONI TECNICHE

Reagenti del kit

- **Residui rimasti nei pozzetti** causati dal processo di produzione, vengono completamente eliminati dai lavaggi durante la procedura descritta e non compromettono in alcun modo i risultati. (fare riferimento al punto 3 della Procedura del Dosaggio Test).
- Leggere attentamente le istruzioni prima di eseguire il test. Le prestazioni del test subiranno un effetto negativo se si utilizzano reagenti diluiti in modo errato, modificati o conservati diversamente da come specificato nelle presenti istruzioni per l'uso.
- I componenti non devono essere utilizzati dopo la data di scadenza riportata sulle etichette.
- Non miscelare reagenti appartenenti a lotti diversi.
- Assicurarsi che non si verifichino cross contaminazioni tra reagenti, campioni o tra pozzetti.
- Lasciare che i reagenti raggiungano la temperatura ambiente. Miscelare bene (agitare con il vortex) i reagenti prima dell'uso.
- Le strip non possono essere riutilizzate.

Estrazione

- Per ottenere risultati quantitativi è importante omogeneizzare l'intero campione di feci nel tampone di estrazione. Evitare la contaminazione nella parte alta del dispositivo – componenti non solubili (non digerite) possono ancora trovarsi nel dispositivo dopo l'estrazione.

Procedura del dosaggio ELISA

- Nella procedura del dosaggio ELISA, **i passaggi del lavaggio** sono essenziali per garantire la riproducibilità dei risultati. **Un tempo minimo di incubazione di almeno 20 secondi** del tampone di lavaggio nei pozzetti, deve essere eseguito in ogni passaggio.
- Usando un lavatore automatico, Bühlmann suggerisce vivamente di usare il "PLATE MODE" ossia erogazione/aspirazione sequenziale su tutte le strip, così che il tempo minimo di incubazione sia garantito.
- **E' importante che il numero di lavaggi consigliato sia rispettato** per assicurare la riproducibilità dei risultati.
- **L'agitatore per le micropiastre** deve essere impostato ad una velocità di 450 rpm (<10 Hz). Una frequenza di rotazione superiore potrebbe causare una scarsa linearità nelle diluizioni per valori tra 300/900 e 600/1800 µg/g. Il movimento circolare dell'agitatore è preferibile a quello latero-laterale.

- Per assicurare la reazione completa antigene/anticorpo, il periodo d`incubazione al punto 5 della procedura, deve essere di almeno 30 min. Un'incubazione moderatamente più lunga (fino a 5 minuti) non influenza la procedura.
- Il marcatore enzimatico è inattivato con ossigeno ed è altamente sensibile alla sodio azide, al thimerosal, all'acido ipocloroso ed ai cloroidrocarboni aromatici che spesso si trovano nei rifornimenti d'acqua di laboratorio .Di conseguenza usare solo acqua deionizzata di elevata qualità.
- Dal momento che le condizioni variano da saggio a saggio, si deve creare una nuova curva standard ogni volta che viene eseguito una nuova analisi. Si consiglia un allineamento verticale.
- Se la concentrazione iniziale di un campione non noto è maggiore del Calibratore E, il campione deve essere ulteriormente diluito con il Tampone d'Incubazione e dosato ancora secondo procedura. Il fattore di diluizione applicato dovrà essere preso in considerazione per i calcoli finali.

RACCOLTA E CONSERVAZIONE DEI CAMPIONI

Se si utilizzano i dispositivi di estrazione, è necessario meno di 1g di feci originali per la procedura di estrazione. Raccogliere il campione di feci in provette o contenitori e conservarlo refrigerato a 2-8℃ per almeno 6 giorni .
Gli estratti sono stabili a 2-8℃ per almeno 7 giorni e a ≤-20℃ per almeno 24 mesi.
Attenzione: Il campione deve esser raccolto senza alcun additivo chimico o biologico presente nel dispositivo.

STANDARDIZZAZIONE

Il kit BÜHLMANN fCAL™ ELISA è calibrato con la MRP8/14 purificata da granulociti umani.

PROCEDURA DI ESTRAZIONE DI CAMPIONI DI FECI

Procedura d'estrazione standard

1. Etichettare e pesare (tarare) la provetta di polipropilene vuota insieme all'ansa per inoculazione.
2. Prelevare da 50 a 100 mg del campione di feci mediante l'ansa per inoculazione e metterlo nella provetta prepesata.
3. Calcolare il peso netto del campione, spezzare l'ansa per inoculazione e lasciare la parte finale dell'ansa nella provetta.
4. Aggiungere il Tampone d'estrazione corrispondente alla formula

   x mg di feci **x 49** = y µl tampone d'estrazione

   (per es. 50 mg di feces + 2450 µl tampone d'estrazione) alla provetta e chiuderla.
5. Omogenizzare il campione in un vortex per provette scuotendo vigorosamente (velocità massima) per 30 min.
6. Trasferire il composto omogeneizzato in una provetta eppendorf da 2 mL e centrifugare in una microcentrifuga per 5 min a 3'000 x g
7. Trasferire il surnatante in una nuova provetta con etichetta e proseguire la procedura ELISA.

Procedure di estrazione con utilizzo di sistemi di estrazione delle feci

La procedura di estrazione è descritta e illustrata nelle istruzioni per l'uso fornite assieme ai rispettivi sistemi di estrazione.

1. Dispositivo CALEX® Cap (codice B-CALEX-C50/ B-CALEX-C200): I tubi di estrazione sono già riempiti con tampone di estrazione.

Importante: Dopo l'estrazione, centrifugare il dispositivo CALEX® Cap per 5 min a 500 x g e proseguire con la procedura del test.

2. Sistema di estrazione delle feci Roche (Codice: 10745804322) o BÜHLMANN **Smart-Prep** (Codice: B-CAL-RD): È possibile ridurre il tempo di estrazione (con vortex) a 1 min.

3. ScheBo® Quick-Prep™ (Codice: B-CAL-SOFI): Le provette di estrazione sono già riempite con tampone di estrazione.

Importante: Dopo l'estrazione con Smart-Prep e ScheBo® Quick-Prep™ centrifugare le provette per 5 minuti a 3000 g. Alternativamente, trasferire l'omogenato in una provetta di Eppendorf da 2 mL e centrifugare in microcentrifuga per 5 minuti a 3000 x g. Decantare il surnatante in una nuova provetta con etichetta e proseguire con la procedura del test.

RANGE DI MISURAZIONE ELISA

Il dosaggio può essere effettuato con le seguenti procedure: procedura ELISA a basso range o a range esteso. La scelta dell'una o dell'altra procedura dipende dalla concentrazione di Calprotectina attesa dei campioni. Per campioni fino a 600 µg/g scegliere la procedura a basso range (range di misurazione 10 – 600 µg/g).

Se le concentrazioni dei campioni tendono a superare i 600 µg/g, scegliere la procedura a range esteso (range di misurazione 30 – 1800 µg/g).

PROCEDURA DEL TEST

Importante: Lasciare equilibrare i reagenti a 18-28℃ prima dell'uso. Diluire solamente gli estratti di feci. Calibratori e controlli sono pronti all'uso.

1. **DILUIZIONE DEL CAMPIONE DI FECI**

RANGE DI MISURAZIONE 10 – 600 µg/g

1.1. **Procedura con pesatura manuale, con Smart Prep o ScheBo® Quick Prep™:** Diluire gli estratti 1:50 con il tampone di incubazione (es. 20 µL di estratto e 980 µL di tampone di incubazione) e mescolare bene. Lasciare equilibrare i campioni per almeno 5 min a 18-28℃ prima di procedere al punto 4c.

1.2. **Dispositivo CALEX® Cap:** Diluire gli estratti 1:5 con il tampone di incubazione (es. 100 µL di estratto e 400 µL di tampone di incubazione) e mescolare bene. Lasciare equilibrare i campioni per almeno 5 min a 18-28℃ prima di procedere al punto 4c.

RANGE DI MISURAZIONE 30 – 1800 µg/g

Il range di misurazione può essere esteso di un fattore 3, se si diluiscono i campioni 1:7500 invece di 1:2500. Questa procedura è raccomandata qualora si prevedano valori elevati di calprotectina. La precisione e la linearità del saggio consentono questa estensione del range di misurazione.

1.1. **Procedura con pesatura manuale, con Smart Prep o ScheBo® Quick Prep™:** Diluire gli estratti 1:150 con il tampone di incubazione (es. 20 µL di estratto e 2980 µL di tampone di incubazione) e mescolare bene. Lasciare equilibrare i campioni per almeno 5 minuti a 18-28℃ prima di procedere al punto 4c.

1.2. **Dispositivo CALEX® Cap:** Diluire gli estratti 1:15 con il tampone di incubazione (es. 50 µL di estratto e il 700 µL di tampone di incubazione) e mescolare bene. Lasciare equilibrare i campioni per almeno 5 minuti a 18-28℃ prima di procedere al punto 4c.

2. Preparare una piastra con le strip sufficienti per il numero richiesto di calibratori, controlli e campioni diluiti. Rimuovere le strip in eccesso dal contenitore e risigillarle immediatamente nella busta di alluminio con l'essiccante. Conservarle refrigerate.

3. Lavare i pozzetti coattati due volte usando almeno 300 µL di Tampone di Lavaggio per pozzetto. Svuotare i pozzetti scuotendo la piastra energicamente su carta per blotting.

Importante: per i tre passaggi di lavaggio con il tampone di lavaggio, **deve essere assicurato un tempo di incubazione minimo di 20 secondi** (vedi Precauzioni Tecniche – Procedura del dosaggio ELISA)

4a. Dispensare 100 µL di Tampone d'Incubazione nel pozzetto rispettivo (Bianco).

Dispensare 100 µL del Calibratore A-E nei rispettivi pozzetti.

4b. Dispensare 100 µL di Controllo Basso e Alto nei rispettivi pozzetti.

4c. Dispensare 100 µL di ogni campione diluito nei successivi pozzetti.

5. Coprire la piastra con un foglio sigillante e incubarla per 30+5 minuti massimo su un mixer impostato a 450 rpm a 18-28℃ (vedi Precauzioni Tecniche - Procedura del dosaggio ELISA).

6. Rimuovere ed eliminare il foglio sigillante. Svuotare i pozzetti e lavare 3 volte usando almeno 300 µL di Tampone di Lavaggio per pozzetto (vedi Precauzioni Tecniche - Procedura del dosaggio ELISA). Svuotare i pozzetti scuotendo la piastra energicamente su carta per blotting.

7. Dispensare 100 µL di Marcatore enzimatico in ogni pozzetto.

8. Coprire la piastra con un foglio sigillante e incubarla per 30±5 minuti massimo su un mixer impostato a 450 rpm a 18-28℃.

9. Rimuovere ed eliminare il foglio sigillante. Svuotare i pozzetti e lavare **cinque volte** usando almeno 300 µL di Tampone di Lavaggio per pozzetto. Svuotare i pozzetti scuotendo la piastra energicamente su carta per blotting.

Importante: lasciare che la soluzione di substrato TMB raggiunga 18-28℃.

10. Dispensare 100 µL di Soluzione di Substrato TMB in tutti i pozzetti.

11. Coprire la piastra con un foglio sigillante, proteggere la piastra dalla luce diretta ed incubarla per 15 ± 2 minuti su un mixer impostato a 450 rpm a 18-28℃.

12. Dispensare 100 µL di Soluzione di Stop in tutti i pozzetti. Eliminare le bolle d'aria con un puntale. Procedere al punto 13 entro 30 minuti.

13. Leggere l'assorbanza a 450 nm in un lettore per micropiastre.

RISULTATI E CALCOLO

Leggere l'assorbanza a 450 nm in un lettore per micropiastre per ognuno dei calibratori, controlli e campioni e con un modello di regressione logistica 4 parametri, calcolare la concentrazione di Calprotectina dei campioni.

RANGE DI MISURAZIONE 10 – 600 µg/g

Se si sceglie la procedura ELISA a basso range, si dovrà far riferimento alle seguenti concentrazioni di calibratori: **10, 30, 100, 300 e 600 µg/g** di Calprotectina.
Ulteriori fattori di diluizione devono essere moltiplicati con i risultati per ottenere i risultati finali.
Per dati di riferimento vedere Table 19 e Figure 1 (risultati e curva standard). *Questi risultati e la curva standard sono forniti a solo scopo dimostrativo. Una curva standard deve essere generata per ogni set di campioni.*

RANGE DI MISURAZIONE 30 – 1800 µg/g
Se si sceglie la procedura ELISA a range esteso, si dovrà far riferimento alle seguenti concentrazioni di calibratori: **30, 90, 300, 900 e 1800 µg/g** di Calprotectina**.**
Ulteriori fattori di diluizione devono essere moltiplicati con i risultati per ottenere i risultati finali.
Per dati di riferimento vedere (risultati e curva standard). *Questi risultati e la curva standard sono forniti a solo scopo dimostrativo. Una curva standard deve essere generata per ogni set di campioni.*

CARATTERISTICHE DEL TEST

RANGE DI MISURAZIONE 10 – 600 µg/g

Le caratteristiche di prestazione del dosaggio sono state convalidate in duplicato.

Precisione Intra-Saggio: 4.7 %. La precisione intra-saggio è stata calcolata sui risultati di 20 duplicati di valori da 3 campioni di estratto fecale, dosati in un'unica seduta secondo la procedura del saggio. I valori sono presentati in Table 20.
Precisione Inter-Saggio: <15 %. La precisione inter-saggio (media) della procedura ELISA è stata calcolata su 5 campioni di estratti fecali. Le aliquote sono state dosate, con la procedura prevista per il dosaggio, in 10 diverse sedute da tre tecnici, utilizzando 2 lotti del kit in due diversi laboratori. I valori sono presentati in Table 21.
Limite del Bianco (LoB): <10 µg/g. Venti duplicati di Tampone d'Incubazione sono stati dosati in un'unica seduta. La media e la deviazione standard sono state calcolate per i valori di assorbanza. La dose minima rilevabile di Calprotectina è stata calcolata nettamente al di sotto del Calibratore A (10 µg/g) aggiungendo due deviazioni standard all'assorbanza media e intersecando questo valore con la curva standard ottenuta in una nuova seduta.
Limite di Quantificatione (LoQ): <10 µg/g. Dieci diversi campioni di feci con valori tra 5.2 e 1254 µg/g di Calprotectina sono stati misurati 20 volte in duplicato. La % del CV ed i valori medi sono stati calcolati per ciascun campione. Il LoQ è stato osservato al 15 % del CV. Il profilo di precisione osservato (Figure 2) permette dosaggi accurati entro la gamma standard da 10 a 600 µg/g.
Linearità di Diluizione: 103 %. Sette campioni di feci con valori elevati di Calprotectina sono stati prelevati secondo la procedura del saggio. L'estratto è stato diluito con Tampone d'Incubazione e successivamente dosato secondo il protocollo. I valori attesi sono stati calcolati dai valori osservati con la prima diluizione. I valori sono presentati in Table 22.
Rilevazione da inoculo: 100 %. Due campioni di estratti fecali sono inoculati con diverse quantità di siero umano contenente Calprotectina. I campioni sono stati misurati prima e dopo l'inoculo secondo la procedura. I valori sono presentati in
Table 23.

Cross-reattività: <0.1%. I Tamponi d'Incubazione inoculati con diverse quantità di MRP8 e MRP14 ricombinante sono stati misurati secondo la procedura. I valori sono presentati in Table 28.

RANGE DI MISURAZIONE: 30 – 1800 µg/g

Precisione Intra-Saggio: 4.0 %. La precisione intra-saggio (media) è stata calcolata a partire dai risultati di 20 duplicati da 3 campioni di estratti fecali dosati in una singola seduta secondo la procedura del saggio. I valori sono presentati in Table 25.

Precisione Inter-Saggio: <15 %. La precisione inter-saggio (media) della procedura ELISA è stata calcolata da 5 campioni di estratti fecali. Le aliquote sono state dosate con la procedura prevista per il dosaggio in 10 diverse sedute da tre tecnici, utilizzando 2 lotti del kit in due diversi laboratori. I valori sono presentati in Table 26.

Limite di Quantificatione (LoQ): <30 µg/g. 18 campioni di feci con valori di Calprotectina compresi tra 10.8 e 2080 µg/g sono stati analizzati 20 volte in duplicato in un'unica seduta. Per ciascun campione sono stati calcolati il CV in % e i valori medi. Il LoQ è stato calcolato al 15 % di CV. Il profilo di precisione osservato consente determinazioni precise entro l'intero range standard da 30 a 1800 µg/g. I risultati sono riportati in Figure 4.

Linearità di diluizione: 102 %. Cinque campioni di feci con concentrazioni elevate di Calprotectina sono stati estratti con la procedura prevista per il saggio. Gli estratti sono stati diluiti con tampone di incubazione e successivamente dosati con la procedura prevista per il saggio. I valori attesi sono stati calcolati a partire dal valore osservato rilevato con la prima diluizione. I valori sono presentati in Table 27.

INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

La valutazione della Calprotectina nelle feci è un metodo facile e attendibile, per distinguere tra malattie gastrointestinali funzionali e organiche.

In uno studio clinico condotto su 401 pazienti sintomatici, la Calprotectina è stata determinata prima di eseguire una colonscopia. L`esame endoscopico ha mostrato 273 pazienti con malattie gastrointestinali funzionali, mentre 128 pazienti con varie malattie organiche (colite, Crohn`s, ulcera, diverticolite, polipi, adenomi, cancro o malattie infettive) (réf. 12).

Analisi di curve ROC (AUC 0.935) mostrano un cut-off clinico ottimale ad un valore di 50 µg/g. Applicando questo valore (cut-off), viene raggiunta una sensibilità di 84.4% e specificità clinica di 94.5%. Ciò rende possibile la differenziazione tra malattie gastrointestinali funzionali e organiche (vedi . Table 29).

La concentrazione di Calprotectina nelle feci è comparabile in adulti e bambini, mentre nei neonati può essere significativamente più elevata (ref. **8**).

Questi dati supportano le seguenti raccomandazioni per l'interpretazioni dei risultati:

Valori normali sotto i 50 µg/g:

I valori di Calprotectina <50 µg/g non sono indicativi di una infiammazione del tratto gastrointestinale. Per pazienti con bassi livelli di Calprotectina probabilmente non sono necessarie ulteriori procedure invasive per determinare le cause dell'infiammazione (ref.12).

Valori elevati compresi tra i 50 e i 200 µg/g:

I valori di Calprotectina compresi tra i 50 e i 200 µg/g possono rappresentare una debole malattia organica come una infiammazione causata da NSAID, una debole diverticolite e una IBD in fase di remissione. La bassa risposta infiammatoria mostrata in questo range può suggerire di ripetere la misurazione e di effettuare ulteriori investigazioni.

Valori elevati sopra i 200 µg/g:

I valori di Calprotectina >200 µg/g sono indicativi di una malattia attiva organica con infiammazione nel tratto gastrointestinale. Sono suggerite appropriate ulteriori procedure investigative e curative eseguite da specialisti.

Il cut-off suggerito per gli adulti (50 µg/g) può essere anche usato per i bambini con età compresa tra i 4 e i 17 anni senza differenziazione di sesso (ref.9).

CONTROLLO DI QUALITA'

Per un uso efficace del prodotto è necessaria un'approfondita comprensione di queste istruzioni. Si otterranno risultati attendibili soltanto attraverso l'utilizzo di precise tecniche di laboratorio (attuali linee guida GLP) e seguendo accuratamente queste istruzioni per l'uso.

Dal momento che non esiste in commercio un controllo di qualità esterno per Calprotectina, si consiglia l'uso di un pool di estratti positivi per il controllo di qualità interno.

La riproducibilità dei parametri della curva standard e dei valori di controllo deve rientrare entro determinati limiti di accettabilità del laboratorio. I limiti di confidenza per i Controlli sono lotto-specifici e riportati sul Foglio Dati di QC aggiunto al kit.

Se la precisione del dosaggio non correla con i limiti stabiliti e la ripetizione esclude errori nella tecnica, verificare quanto segue: i) dispensazione, controllo della temperatura e timer ii) settaggio del lettore ELISA, iii) date di scadenza dei reagenti iv) condizioni di conservazione e di incubazione v) Soluzione di Substrato TMB deve essere incolore, vi) purezza dell'acqua.

LIMITI

- I reagenti forniti con questo kit sono ottimizzati per dosare Calprotectina umana in campioni fecali estratti.
- I risultati del test vanno interpretati insieme alle informazioni derivanti dagli studi epidemiologici, dalla valutazione clinica del paziente e da altre procedure diagnostiche.

ESPAÑOL

USO PREVISTO

El kit BÜHLMANN fCAL™ ELISA está pensado para la extracción y la determinación cuantitativa de la Calprotectina humana (MRP8/14; S100A8/S100A9) en muestras de deposiciones (ref. 1-3).

PRINCIPIOS BÁSICOS DEL ENSAYO

Después de un procedimiento corto de extracción con un volumen de heces y 49 volúmenes de tampón de extracción, la prueba permite la medición selectiva del antígeno Calprotectina mediante un ELISA intercalado. Un anticuerpo de captura monoclonal (AcMo) altamente específico para los complejos heterodiméricos y poliméricos de Calprotectina (ref. 4-5) recubre la Microplaca. Los Calibradores, controles y los extractos de los pacientes se incuban a temperatura ambiente por 30 minutos. Después de un paso de lavado, un segundo anticuerpo (Ac) de detección conjugado con Peroxidasa de Rábano (HRP) detecta las moléculas de Calprotectina unidas al anticuerpo monoclonal que recubre la placa Tras la incubación y un nuevo paso de lavado se añade tetrametilbenzidina (TMB) (formación de color azul) seguido de una solución de interrupción(cambia a color amarillo). La absorción se mide a 450 nm.

REACTIVOS INCLUIDOS Y PREPARACIÓN

Reactivos	EK-CAL	EK-CAL2	Código	Reconstitución
	Cantidad			
Tampón de extraccíon	3 botellas de 125 mL	6 botellas de 125 mL	B-CAL-EX	Listo para usar
Microplaca recubierta con AcMo anti-Calprotectina	12 x 8 pocillos	2 x 12 x 8 pocillos	B- CAL - MP	Listo para usar
Sellador de placas	3 unidades	6 unidades		
Tampón de lavado concentrado (10x) concentrado con conserv.	1 botella 100 mL	2 botellas de 100 mL	B- CAL - WB	Diluir con 900 mL de agua desionizada
Tampón de incubación con conservantes	2 botellas de 125 mL	3 botellas de 125 mL	B- CAL -IB	Listo para usar
Calibradores A a E[1) 2)] Calprotectina en una matriz de tampón con conserv.	5 viales de 1 mL	5 viales de 1 mL	B-CAL-CASET	Listo para usar
Control bajo/alto[3)] Matriz de suero humano con conservantes	2 viales de 1 mL	2 viales de 1 mL	B-CAL-CONSET	Listo para usar
Marcador enzimático Ac anti-Calprotectina conjugado con HRP	1 vial 12 mL	2 viales de 12 mL	B- CAL -EL	Listo para usar
Substrato de TMB TMB en tampón Citrato	1 vial 12 mL	2 viales de 12 mL	B-TMB12	Listo para usar
Solución de interrupción Ácido Sulfúrico 0,25 M	1 vial 12 mL	2 viales de 12 mL	B- STS12	Listo para usar **Agente corrosivo**

Table 13

1) Las concentraciones efectivas de los estándares A a E son 4, 12, 40, 120, 240 ng/mL de Calprotectina, respectivamente. Durante la extracción y dilución adicional de los extractos para la medición en el ELISA, se produce una dilución total de 1:2500.
Para tener en cuenta esos pasos de dilución para los cálculos finales, las concentraciones de los calibradores A al E para el procedimiento ELISA de bajo intervalo de medición son: 10, 30, 100, 300 y 600 µg/g de Calprotectina.

2) Para el procedimiento ELISA de intervalo de medición extendido se requiere utilizar las siguientes concentraciones de calibradores en el protocolo ELISA respectivo: 30, 90, 300, 900 y 1800 µg/g de Calprotectina.

3) Los controles contienen cantidades específicas de lote de Calprotectina humana nativa. Ver la hoja de datos de QC adicional para las concentraciones reales.

ALMACENAMIENTO Y DURACIÓN DE LOS REACTIVOS

Reactivos antes de abrir	
Almacenar a 2-8℃. No utilizar el kit después de la fecha de caducidad impresa en las etiquetas.	
Reactivos abiertos / reconstituidos	
Tampón de extraccíon	Almacénese a 2-8℃ hasta la fecha de caducidad.
Microplaca	Guarde inmediatamente las filas que no ha utilizado en la bolsa de aluminio que contiene los sacos desecantes y vuelva a cerrarla completamente por toda la cremallera. Almacénese a 2-8℃ hasta la fecha de caducidad.
Tampón de lavado	Almacénese hasta 6 meses a 2-8℃.
Tampón de incubación	Almacénese a 2-8℃ hasta la fecha de caducidad.
Calibradores	
Controles	
Marcador enzimático	
Substrato de TMB	
Solución de interrupción	

Table 14

REACTIVOS SUMINISTRADOS PREVIO PEDIDO

Tubos deextracción de heces

Dispositivos CALEX® Cap	Embalajes con 50 o 200 dispositivos,cada uno rellenado con tampón de extracción, 5 mL / listos para uso	B-CALEX-C50 B-CALEX-C200
Smart-Prep	50 tubos, espátulas y fondos	B-CAL-RD
ScheBo® Quick-Prep™	50 tubos de extracción, cono & punta 1.3 mL de tampón de extracción, listo para usar.	B-CAL-SO50

Table 15

PRECAUCIONES

PRECAUCIONES DE SEGURIDAD

- Las filas de microtitulación, calibradores y controles de este kit contienen componentes de origen humano. Aunque ha dado negativo para el antígeno de superficie de HBV y anticuerpos HCV y VIH1/2, los reactivos deben manipularse como si fueran susceptibles de transmitir infecciones y deben manejarse de acuerdo con las Buenas Prácticas de Laboratorio, tomando las precauciones adecuadas.
- **Solución substrato y solución de interrupción:** La solución substrato (B-TMB12) contiene tetrametilbenzidina (TMB) y peróxido de hidrógeno. La solución de interrupción (B-STS12) contiene ácido sulfúrico. Los dos reactivos pueden irritar los ojos, la piel y las membranas mucosas. Evite el contacto con los ojos, la piel y la ropa.
- En cuanto a las precauciones adecuadas que debe tomar para la correcta eliminación de los reactivos del kit, recomendamos encarecidamente consultar con anterioridad la normativa local específica de su país.

PRECAUCIONES TÉCNICAS

- **Residuos pueden formarse en los pocillos** durante el processo de la producción. Ellos estan eliminado completamente durante lavar los pocillos y no tienen ninguna influencia en los resultados (véase a punto 3 de la instrucción de uso).
- Lea atentamente las instrucciones antes de realizar el ensayo. El rendimiento del ensayo se verá gravemente

afectado si los reactivos son incorrectamente diluidos, modificados o almacenados en condiciones distintas a las que se detallan en estas instrucciones de uso.
- Los componentes no deben utilizarse después de la fecha de caducidad impresa en las etiquetas.
- No mezcle diferentes lotes de reactivos.
- Debe hacerse todo lo posible para garantizar que no se produzca contaminación cruzada entre reactivos, muestras o entre pocillos.
- Deje que los reactivos alcancen la temperatura ambiente (18-28°C) y mézclelos bien (con agitador de vórtice) antes de ser utilizados.
- Los micropocillos no deben ser reutilizados.

Extracción
- Para obtener resultados cuantitativos es importante homogenizar toda la muestra de feces pesada en el tampón de extracción. Evitar la contaminación en la parte superior del tubo – tras la extracción puede haber todavía en el tubo componentes insolubles (no solubilizados).

Procedimiento del ELISA
- En el procedimiento de ELISA **los pasos de lavado** son esenciales para garantizar de resultados reproducibles. Asegúrese de incubar el tampón de lavado en los pozos un tiempo mínimo de **20 segundos.**
- Usando una **arandela automatizada**, Bühlmann recomienda realizar el proceso de dispensado y aspiración secuencialmente, antes de proceder al pasosiguiente. Así, el tiempo mínimo de la incubación está garantizado.
- **El Agitador de placas de microtitulación** debe ser ajustado a 450 rpm (< 10 Hz). Una frecuencia de rotación más alta puede causar resultados pobres de dilución entre valores de 300/900 y 600/1800 µg/g. La rotación es preferible a la sacudida horizontal.
- **Las repeticiones indicadas del lavado son obligatorias** para asegurar resultados reproducibles .
- Para asegurar una interacción completa de antigeno/ anticuerpo, **el tiempo de la incubación en el paso 5** no debe ser menor de 30 minutos. Un tiempo moderado más largo de incubación (hasta 5 minutos) no tiene ninguna influencia en el resultado final.
- La enzima utilizada como marcador se inactiva por oxígeno y es altamente sensible a Azida Sódica, Timerosal, Ácido Hipocloroso y Clorohidrocarburos aromáticos, que se encuentran con frecuencia en los suministros de agua de laboratorio. Por tanto, utilice únicamente agua desionizada de alta calidad.
- Puesto que las condiciones varían de ensayo a ensayo, debe generarse una nueva curva estándar cada vez que se realice un nuevo ensayo. Se recomienda la alineación vertical.
- Si la concentración inicial de una muestra desconocida es mayor que el calibrador más alto (calibrador E), la muestra debe diluirse con tampón de incubación e incubarse de nuevo según el procedimiento del ensayo. El factor de dilución resultante debe tenerse en cuenta para los cálculos finales.

MATERIALES NECESARIOS NO INCLUIDOS

Procedimiento de extracción
- Asas de inoculación de 10 µL desechables
- Tubos de polipropileno de 15 mL con tapones de rosca necesarios para el procedimiento de extracción estándar o los dispositivos de extracción (véase anteriormente).
- Campana de flujo laminar
- Mezclador vortex multitubo
- Balanza de precisión (10-150 mg)
- Microcentrífuga (≥3000 x g)
- Centrífuga (≥500 x g)

Procedimiento de ELISA
- Pipetas de precisión con puntas desechables de 10 µL, 100 µL y 1000 µL.
- Tubos desechables de poliestireno o polipropileno para la preparación de las diluciones de muestra.
- Cilindro graduado de 1000 mL para la dilución del tampón de lavado concentrado.
- Lavador de placas de microtitulación o botella flexible para el tampón de lavado.
- Agitador de placas de microtitulación.
- Papel secante.
- Lector de placas de microtitulación para la medición de la absorbancia a 450 nm.

OBTENCIÓN Y CONSERVACIÓN DE MUESTRAS

El procedimiento requiere de 50 a 100 mg de muestra de hecespara cada extracción.
Recoger la muestra de heces en tubos desechables de poliestireno o polipropileno y conservarla refrigerada a 2-8℃ hasta 6 días.
Los extractos son estables a 2-8 ℃ por lo menos 7 dias y a ≤–20℃ por lo menos 24 meses.
Importante: La muestra debe tomarse sin aditivos.

ESTANDARIZACIÓNE

El kit BÜHLMANN fCAL™ ELISA se calibra con MRP8/14 purificada de granulocitos humanos.

PROCEDIMIENTO DE EXTRACCIÓN

Procedimiento de extracción estándar

1. Etiquetar y pesar (tarar) el tubo de polipropileno vacío junto con el asa de inoculación.
2. Extraer de 50 a 100 mg de la muestra de heces descongelada mediante el asa de inoculación y colocarlos en el tubo pesado previamente.
3. Calcular la cantidad neta de muestra, romper el asa de inoculación y dejar la parte inferior del asa en el tubo.
4. Añadir tampón de extracción según la fórmula
   x mg de heces **x 49** = y µl tampon de extracción
   (i.e 50 mg de heces + 2450 µl tampon de extracción)
   al tubo y cerrar el tubo:
5. Homogenizar la muestra en un mezclador vortex multitubo agitándolo vigorosamente (velocidad más alta) durante 30 minutos.
6. Transferir el homogenizado a un tubo Eppendorf de 2 mL y centrifugar en microcentrífuga durante 5 minutos a 3'000 x g
7. Transferir el sobrenadante a un tubo nuevo etiquetado y continuar con el procedimiento ELISA.

Procedimientos de extracción utilizando dispositivos de extracción de heces

El procedimiento de extracción se describe y se ilustra en las instrucciones de uso entregadas con los respectivos dispositivos de extracción.

1. **Dispositivo CALEX® Cap** (código B-CALEX-C50 / B-CALEX-C200) : Los tubos contienen 5.0 mL de tampón de extracción.

Importante: Tras la extracción centrifugue los extractos durante 5 minutos a 500 x g y prosiga con el Procedimiento.

2. Dispositivo de extracción de heces Roche (código 10745804322) o BÜHLMANN **Smart-Prep** (código B-CAL-RD): El tiempo de extracción (vórtex) puede reducirse a 1 minuto.

3. ScheBo® Quick-Prep™ (código B-CAL-SO50): Los tubos de extracción contienen tampón de extracción.

Importante: Tras la extracción con Smart-Prep o ScheBo® Quick-Prep™, centrifugue los extractos durante 5 minutos a 3000 x g. Alternativamente, transfiera el homogeneizado a un tubo Eppendorf de 2 mL y centrifuguelo en una microcentrífuga durante 5 minutos a 3000g. Decante el sobrenadante a un nuevo tubo etiquetado y prosiga con el Procedimiento.

PROCEDIMIENTO DEL ELISA

El ensayo se puede realizar de acuerdo con los siguientes procedimientos, ELISA de rango bajo o de rango extendido. La elección del procedimiento depende de la concentración de Calprotectina esperada en las muestras. Para muestras de hasta 600 µg/g se elegirá el procedimiento rango bajo intervalo de medicion 10 – 600 µg/g. Si las muestras sobrepasan el nivel de 600 µg/g se debe elegir el procedimiento de rango extendido intervalo de medicion 30 – 1800 µg/g.

PROCEDIMIENTO

Importante: Dejar que los reactivos alcancen los 18-28℃ antes de su uso.
Diluir sólamente los extractos de heces. Calibradores y controles están listos para usar.

1. **DILUCIÓN DE LAS MUESTRAS DE HECES.**

PROCEDIMIENTO ELISA DE BAJO INTERVALO DE MEDICIÓN 10 – 600 µg/g

1.1. **Procedimiento manual de pesado, Smart Prep o ScheBo® Quick Prep™:** Diluir los sobrenadantes 1:50 con tampon de incubación (e.g. 20 µL extracto y 980 µL tampon de incubación) y mezclar bien. Dejar reposar las muestras diluidas al menos 5 minutos a 18-28℃ antes del pipeteado del paso 4c del PROCEDIMIENTO.

1.2. **Dispositivo CALEX® Cap:** Diluir los sobrenadantes 1:5 con tampon de incubación (e.g. 100 µL extracto y 400 µL tampon de incubación) y mezclar bien. Dejar reposar las muestras diluidas al menos 5 minutos a 18-28℃ antes del pipeteado del paso 4c del PROCEDIMIENTO.

PROCEDIMIENTO ELISA DE BAJO INTERVALO DE MEDICIÓN 30 – 1800 µg/g

El intervalo de medición se puede extender en un factor de 3 si se diluyen las muestras a 1:7500 en lugar de 1:2500. Este procedimiento es el recomendado si se esperan concentraciones altas de Calprotectina. La precisión y la linealidad del ensayo hacen posible esta extensión del intervalo de medición del kit de análisis.

1.1. **Procedimientomanual de pesado, Smart Prep o ScheBo® Quick Prep™:** Diluir los sobrenadantes 1:150 con tampon de incubación (e.g. 20 µL extracto y 2980 µL tampon de incubación) y mezclar bien. Dejar reposar las muestras diluidas al menos 5 minutos a 18-28℃ antes del pipeteado del paso 4c.

1.2. **Dispositivo CALEX® Cap:** Diluir los sobrenadantes 1:15 con tampon de incubación (e.g. 50 µL extracto y 700 µL tampon de incubación) y mezclar bien. Dejar reposar las muestras diluidas al menos 5 minutos a 18-28℃ antes del pipeteado del paso 4c.

2. Prepare una placa con filas suficientes para probar el número requerido de calibradores, controles y muestras diluidas. Retire las filas sobrantes del soporte y vuelva a guardarlas en la bolsa de aluminiojunto con los sacos desecantes **sin demora**. Almacénelo a 2-8℃

3. Lave dos veces los pocillos recubiertos utilizando como mínimo 300 µL de tampón de lavado por pocillo. Vacíe los pocillos y sacuda la placa firmemente en papel secante.

Importante: Asegúrese de incubar el tampón de lavado en los pozos un tiempo mínimo de 20 segundos para cada de los tres pasos de lavado.

4a. Pipeteé 100 µL de tampón de incubación en el pocillo respectivo.

Pipeteé 100 µL de calibrador A-E en los pocillos respectivos.

4b. Pipeteé 100 µL del Control sérico bajo y alto en los pocillos respectivos.

4c. Pipeteé 100 µL de cada muestra diluida en los pocillos subsiguientes.

5. Selle la microplaca con una alfombrilla de sellado, coloque la placa en un mezclador de placas ajustado a 450 rpm e incube durante 30 + 5 minutos a 18-28℃ (vea las precauciones técnicas)

6. Retire y deseche la alfombrilla de sellado. Vacíe los pocillos y lávelos tres veces utilizando como mínimo 300 µL de tampón de lavado por pocillo (vea las precauciones técnicas - procedimiento de ELISA, página 24- 25). Vacíe los pocillos y sacuda la placa firmemente en papel secante.

7. Pipeteé 100 µL de marcador enzimático en todos los pocillos.

8. Cubra la placa conuna alfombrilla de sellado, coloque la placa en un mezclador de placas ajustado a 450 rpm e incube durante 30 ± 5 minutos a 18-28℃.

9. Retire y deseche la alfombrilla de sellado. Vacíe los pocillos y lávelos **cinco veces** utilizando como mínimo 300 µL de tampón de lavado por pocillo. Vacíe los pocillos y sacuda la placa firmemente en papel secante.

Importante: Deje que la solución substrato de TMB alcance 18-28℃.

10. Pipeteé 100 µL de solución substrato de TMB en todos los pocillos.

11. Cubra la placa con la alfombrilla de sellado, coloque la placa en un mezclador de placas ajustado a 450 rpm, proteja la placa de la luz directa e incube durante 15 ± 2 minutos a 18-28℃.

12. Pipeteé 100 µL de solución de interrupción en todos los pocillos. Elimine las burbujas de aire con la punta de una pipeta. Continúe con el paso 13 al cabo de 30 minutos como máximo.

13. Lea la absorbancia a 450 nm en un lector de placas de microtitulación.

RESULTADOS Y CÁLCULOS

Lea la absorbancia a 450 nm en un lector de placas de microtitulación para cada pocillo del calibrador y del blanco, para cada una de las muestras y de los controles, reste el pocillo del blanco y registre la absorbancia corregida. Lea la concentración de Calprotectina utilizando un algoritmo de cuatro parámetros.

INTERVALO DE MEDICION BAJO 10 – 600 µg/g

Las concentraciones de los calibradores A al E para el procedimiento ELISA de rango bajo son: 10, 30, 100, 300 y 600 µg/g de Calprotectina.

Los factores de dilución addicionales deben ser multiplicados por los resultados para obtener las concentraciónes finales.

Véanse Table 19 y Figure 1 de datos característicos (resultados y curva de calibración). *Atención: Estos resultados y la curva de calibración se proveén solamente parapropósitos de demostración. La curva de calibración debe ser confeccionada cada vez que se analizan nuevas muestras.*

INTERVALO DE MEDICIÓN 30 – 1800 µg/g

Las concentraciones de los calibradores A al E para el procedimiento ELISA de rango extendido son: 30, 90, 300, 900 y 1800 µg/g de Calprotectina.

Los factores de dilución addicionales deben ser multiplicados por los resultados para obtener las concentraciónes finales.

Véanse Table 24 y Figure 3 de datos característicos (resultados y curva de calibración). *Atención: Estos resultados y la curva de calibración se proveén solamente parapropósitos de demostración. La curva de calibración debe ser confeccionada cada vez que se analizan nuevas muestras.*

CARACTERÍSTICAS DE EFICIENCIA

Las características de rendimiento del análisis han sido validadas por duplicado.

INTERVALO DE MÉDICION BAJO 10 – 600 µg/g

Precisión Intraensayo: 4.7 %. La precisión intraensayo se calculó a partir de los resultados de 20 pares de valores de 3 muestras deheces extraídas ensayadas en un solo ciclo, según el procedimiento del ensayo. Los valores se presentan en la Table 20.

Precisión interensayo: <15 %. La precisión (media) interensayo del ELISA se calculó para cinco muestras de extractos de heces. Las alícuotas se analizaron de acuerdo con el procedimiento del ensayo con 10 repeticiones diferentes por tres técnicos de laboratoriousando 2 lotes de kits en dos laboratorios distintos. Los valores se presentan en la Table 21.

Límite para el blanco (LoB): <10 µg/g. Se ensayaron veinte duplicados de tampón de incubación en un único ciclo. Se calculó la desviación de estándar y media para los valores de absorbancia. Se calculó que la dosis mínima detectable de Calprotectina estaba por debajo del Calibrador A (10 µg/g) más dos desviaciones estándar de la absorbancia media y cruzando este valor con la curva estándar obtenida en un nuevo ciclo.

Límite de cuantificación (LoQ): <10 µg/g. 10 muestras de heces distintas, con valores de entre 5.2 y 1254 µg/gde Calprotectina fueron ensayadas 20 veces en duplicados, como un intraensayo. Se calcularon para cada muestra el %CV y los valores medios. Se observó el LoQ a 15 %CV. El perfil de precision (Figure 2) que resulta permite la medida exacta dentro de la gama estándard a partir de 10 a 600 µg/g.

Linealidad de la Dilución: 103 %. Se procedió a la extracción de siete muestras de heces con elevados valores de Calprotectina, según el procedimiento del ensayo. Los extractos fueron diluidos con tampón de incubación y posteriormente incubados de acuerdo con el protocolo. Los valores esperados calculados a partir del valor observado obtenido con la primera dilución se presentan en la Table 22.

Recuperación de *Spiking*: 100 %. Dos muestras de heces extraídas fueron sometidas a *spiking* con distintas cantidades de suero humano diluido que contenía Calprotectina. Las muestras fueron medidas antes y después del *spiking* según el procedimiento de ensayo. Los valores se presentan en la Table 23.

Reactividad cruzada: <0.1 %. Tampón de incubación con distintas cantidades de MRP8 y MRP14 recombinantes fué medido según el procedimiento de ensayo. Los valores se presentan en Table 28.

INTERVALO DE MEDICIÓN: 30 – 1800 µg/g

Precisión intraensayo: 4.0 %. La precisión (media) intraensayo se calculó a partir de los resultados de 20 pares de valores de 3 muestras de extractos de heces, procesados en un solo análisis de acuerdo con el procedimiento del ensayo. Los valores se presentan en la Table 25.

Precisión interensayo: <15 %. La precisión (media) interensayo del ELISA se calculó a partir de 5 muestras de extractos. Las alícuotas se analizaron de acuerdo con el procedimiento del ensayo en 10 repeticiones diferentes por parte de tres técnicos de laboratorio usando 2 lotes de kits en dos laboratorios distintos. Los valores se presentan en la Table 26.

Límite de cuantificación (LoQ) <30 µg/g. 18 muestras de heces con valores de Calprotectina entre 10.8 y 2080 µg/g se midieron 20 veces por duplicado en un ensayo. Se calcularon el coeficiente de variabilidad (CV) y los valores medios para cada muestra. El LoQ fue calculado en base a la concentración de Calprotectina a 15 % del CV. El perfil de la precisión resultante permite una medición precisa en todo el rango estándar, o sea de 30 hasta 1800 µg/g. Los resultados se presentan en la Figure 4.

Linealidad de la dilución: 102 %. Cinco muestras de heces con concentraciones elevadas de Calprotectina fueron extraídas de acuerdo con el procedimiento del ensayo. Los extractos se diluyeron con buffer de incubación y después se analizaron conforme al procedimiento. Los valores esperados se calcularon a partir del valor encontrado en la primera dilución. Los resultados se presentan en la Table 27.

INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

La evaluación de Calprotectina en heces es un método fiable, que posibilita la distinción entre enfermedades orgánicas y enfermedades gastrointestinales funcionales.

En un estudio con 401 pacientesque estaban en lista para realizar una colonoscopia, Los niveles de Calprotectina fecal fueron determinados antes de someterlos a unaendoscopia. La endoscopia confirmó que 273 pacientes sufrían de enfermedades funcionales mientras que 128 pacientes tenían varias enfermedades orgánicas (Colitis, Morbus Crohn, úlceras, diverticulitis, pólipos, adenomas, cáncer, o enfermedades infecciosas) (ref. 12).

Una análisis de la curva ROC (AUC: 0.935) resulta en un valor limite óptimo de 50 µg/g. Aplicando este valor límite la sensibilidad y la especifidad clinica del metodo alcanzó 84,4% y 94,5% respectivamente (véanse Table 29). Esto demuestra que la Calprotectina fecal es una excellente biomarcador para discriminar entre enfermedades orgánicas y funcionales. Por lo tanto, las muestras que

exceden el valor límite de 50 µg/g se pueden considerar como positivas y los pacientes no deben someterse a investigaciones invasivas como la colonoscopia y otras métodos para confirmar una inflamación organica.
La concentración de Calprotectina en heces es comparable en niños y adultos. Por lo tanto, sepuede utilizar el valor de corte (50 µg/g), recomendado para adultos, tambien para niños de 4 a 17 años de edad (ref.8). Las concentraciónes de Calprotectina en recién nacidos son considerablemente elevadas (ref. 9).
Estos datos respaldan la siguiente interpretación de los resultados:

Valores normales por debajo de 50 µg/g:
Estos valores de calprotectina <50 µg/g no son indicativos de inflamación del tracto gastrointestinal. No es probable que pacientes con niveles bajos de Calprotectina fecal precisen de procedimientos invasivos adicionales para determinar la causa de la inflamación (ref. 12).

Valores elevados entre 50 y 200 µg/g:
Los valores de calprotectina entre 50 y 200 µg/g pueden ser representativos de un trastorno orgánico leve tal como inflamación originada por AINE, diverticulitis leve o EII en fase de remisión. La baja respuesta inflamatoria mostrada dentro de ese intervalo puede sugerir la repetición de la medida y la realización de investigaciones adicionales.

Valores elevados por encima de 200 µg/g:
Los valores de calprotectina > 200 µg/g son indicativos de un trastorno orgánico activo con inflamación del tracto gastrointestinal. Sugieren llevar a cabo investigaciones adicionales apropiadas y procedimientos curativos por parte de especialistas.
El nivel de corte sugerido para adultos (50 µg/g) se puede utilizar también para niños de entre 4 y 17 años de edad con independencia del sexo (ref. 9).

CONTROL DE CALIDAD

Es necesario comprender totalmente estas instrucciones de uso para obtener unos resultados satisfactorios. Sólo se obtendrán resultados fiables utilizando técnicas de laboratorio precisas (guías de Buenas Prácticas de Laboratorio actuales) y siguiendo cuidadosamente estas instrucciones de uso.
Dado que no hay un control de extracción para Calprotectina disponible comercialmente, recomendamos el uso de un pool de extractos fecales que den positivo para Calprotectina para el control de calidad interno.
La reproducibilidad de los parámetros de la curva estándar y de los valores de control debe encontrarse dentro de los límites establecidos de aceptabilidad del laboratorio. Los límites de confianza para los controles son específicos del lote y están impresos en la hoja de datos de control de calidad adicional.
Si la precisión del ensayo no se correlaciona con los límites establecidos y la repetición excluye errores de la técnica, compruebe los siguientes aspectos: i) instrumentos de pipeteado, control de temperatura y tiempo ii) ajustes del lector de ELISA iii) fechas de caducidad de los reactivos iv) condiciones de almacenamiento e incubación v) la solución substrato con TMB debe ser incolora vi) pureza del agua.

LIMITACIONES

- Los reactivos suministrados con este kit están optimizados para medir Calprotectina en heces.
- Los resultados del ensayo deben interpretarse considerando la información disponible de estudios epidemiológicos, la evaluación clínica del paciente y otros procedimientos de diagnóstico.

PORTUGUÊS

UTILIZAÇÃO PREVISTA

O kit BÜHLMANN fCAL™ ELISA foi desenvolvido para a extração e determinação quantitativa da calprotectina humana (MRP8/14; S100A8/S100A9) em amostras fecais (ref. 1-3).

PRINCÍPIO DO TESTE

Após um curto procedimento de extração usando um volume de fezes e 49 volume de tampão de extração, o teste leva em consideração a medida seletiva do antígeno calprotectina pela técnica sanduíche ELISA. Uma captura monoclonal de anticorpo (mAb) altamente específica dos complexos heterodimérico e polimérico da Calprotectina (ref. 4-5) respectivamente é recoberta numa microplaca de microtitulação. Calibradores, controles e extratos da amostra do pacientes são incubados à temperatura ambiente por 30 minutos. Depois de uma etapa de lavagem um anticorpo de detecção (Ab) conjugado com peroxidase de raiz-forte (HRP) detecta moléculas de calprotectina ligadas ao anticorpo monoclonal recoberta na placa. Depois da incubação e de uma etapa adicional de lavagem, tetrametilbenzidina (TMB) será acrescentado (formando a cor azul) seguido por uma reação de interrupção (trocando para a cor amarela). A absorção é medida em 450 nm.

REAGENTES FORNECIDOS E PREPARAÇÃO

Reagentes	EK-CAL	EK-CAL2	Código	Reconstituição
	Qtde			
Tampão de extração	3 tubos da 125 mL	6 tubos da 125 mL	B-CAL-EX	Pronto para uso
Microplaca Prerecoberta com anti Calprotectina mAb	12 x 8 poços	2 x 12 x 8 poços	B-CAL-MP	Pronto para uso
Vedador de placa	3 peças	6 peças		
Concentrado de tampão de lavagem (10x) com preservativos	1 tubo da 100 mL	2 tubos da 100 mL	B-CAL-WB	Diluir com 900 mL de H_2O deionizada
Tampão de incubação com conservantes	2 tubos da 125 mL	3 tubos da 125 mL	B-CAL-IB	Pronto para uso
Calibradores A - E[1) 2)] Calprotectina em uma matriz de tampão com conservantes	5 frascos da 1 mL	5 frascos da 1 mL	B-CAL-CASET	Pronto para uso
Controle baixo / alto[3)] soro humano com conservantes	2 frascos da 1 mL	2 frascos da 1 mL	B-CAL-CONSET	Pronto para uso
Marcador enzimático Anti-Calprotectina Ab conjugada com HRP	1 frascos da 12 mL	2 frascos da 12 mL	B-CAL-EL	Pronto para uso
Substrato TMB TMB em tampão de citrato	1 frascos da 12 mL	2 frascos da 12 mL	B-TMB12	Pronto para uso
Solução stop 0,25 M de ácido sulfúrico	1 frascos da 12 mL	2 frascos da 12 mL	B-STS12	Pronto para uso **Agente corrosivo**

Table16

1) A concentração real de calprotectina nos padrões A a E é de 4, 12, 40, 120 e 240 ng /mL, respectivamente. Para extração e subsequente diluição da amostra, uma diluição de 1:2500 foi realizada para adesignação dos calibradores de A a E. As concentrações seguintes têm de ser utilizadas para o procedimento de baixa faixa de ELISA: 10, 30, 100, 300 e 600 ug /g de Calprotectina. .

2) Se você escolher a faixa estendida do procedimento ELISA, as seguintes concentrações devem ser usadas no respectivo protocolo ELISA: **30, 90, 300, 900 e 1800 µg/g de calprotectina.**

3) Os controles contêm quantidades específicas de calprotectina humana no lote. Veja a folha de dados adicional QC para as concentrações reais.

REAGENTES FORNECIDOS MEDIANTE PEDIDO

Dispositivos de extração fecal

CALEX® Cap Device	Embalagem com 50 o 200 tubos com 5mL de tampão de extração, pronto para uso	B-CALEX-C50 B-CALEX-C200
Smart-Prep	50 tubos, espátulas e tampas	B-CAL-RD
Schebo® Quick-Prep™	50 tubos consistindo de tubo, suporte do doseador & doseador, 1,3 mL de tampão de extração pronto para uso	B-CAL-SO50

Table 17

ARMAZENAMENTO PRAZO DE VALIDADE DOS REAGENTES

Reagentes não abertos	
Armazenar a 2-8℃. Não use depois da data de expira ção do kit impresso nas etiquetas.	
Reagentes abertos / reconstituídos	
Tampão de extração	Armazene a 2-8ºC até a data de expiração.
Microplaca	Devolver imediatamente as fileiras não utilizadas para a bolsa metalizada contendo os sacos de dissecadores e selar novamente a beirada inteira do selo zip. Armazenar a 2-8ºC até a data de expiração..
Tampão de lavagem diluído.	Armazenar a 2-8ºC por um período máximo de 6 meses.
Tampão de incubação	Armazenar a 2-8ºC até a data de expiração.
Calibradores	
Controles	
Marcador enzimático	
Substrato TMB	
Solução stop	

Table 18

MATERIAIS NECESSÁRIOS, MAS NÃO INCLUÍDOS

Procedimento de extração

- Alças de inoculação descartáveis de 10 µL
- Tubos de polipropileno com tampas rosqueáveis de 15 mL necessários para o procedimento padrão de extração (veja acima).
- Estação de trabalho de fluxo laminar
- Misturador de vórtice multitubos
- Balança de precisão (10-150 mg)
- Microcentrífuga (≥3000 g)
- Centrífuga (≥500 g)

Procedimento ELISA

- Pipetas de precisão de 10, 100 e 1000 µL com pontas descartáveis.
- Tubos descartáveis de poliestireno ou polipropileno para preparação de diluição de amostras.
- Cilindro de 1000 mL para diluir tampão de lavagem.
- Lavadora de placa e microtituladora (veja precauções técnicas) ou garrafa de apertar para tampão de lavagem.
- Rotador de microplaca (veja precauções técnicas).
- Papel mata-borrão.
- Leitor de placa e microplaca para medição de absorvência a 450 nm.

PRECAUÇÕES

MEDIDAS DE SEGURANÇA

- A microplaca, os calibradores e os controles deste teste contêm componentes de origem humana. Apesar de testados e apresentarem resultado negativo para antígeno de superfície HBV e anticorpos HCV e HIV1/2, os reagentes devem ser manipulados como se fossem capazes de transmitir infecções e devem ser manipulados de acordo com as boas práticas do laboratório, usando as precauções apropriadas.
- **Substrato e solução stop**: O substrato TMB (B-TMB12) contem tetrametilbenzidina, peróxido de hidrogênio (H_2O_2). A solução stop (B-STS12) contem ácido sulfúrico (0,25 M). Cada um desses reagentes é irritante para os olhos, pele e membranas mucosas. Evite contato com os olhos, pele e roupas. Vista vestimentas de proteção adequadas, luvas e proteção dos olhos. Após um contato com os olhos ou com a pele, lave imediatamente com água em abundância.
- Solução não utilizada deve ser descartada de acordo com os regulamentos locais, estaduais e federais.

PRECAUÇÕES TÉCNICAS

Componentes do kit

- **Resíduos nos poços da microplaca** vêm do processo de produção. Eles são removidos na etapa de lavagem (etapa 3 do procedimento de teste) e não afetam os resultados.
- Leia cuidadosamente as instruções antes de realizar o teste. A eficiência do teste pode ser afetada se os reagentes estiverem incorretamente diluídos, modificados ou armazenados em condições que não as detalhadas nestas instruções de uso.
- Componentes não podem ser usados depois da data de expiração impressa nas etiquetas.
- Nunca misture lotes diferentes de reagentes.
- Todas as ações devem ser feitas de modo a garantir que nenhuma contaminação cruzada ocorra entre reagentes, amostras ou entre poços.
- Deixe que os reagentes se ajustem em cada temperatura ambiente. Misture bem (vortex) os reagentes antes de sua utilização.
- Micropoços não podem ser utilizados novamente.

Extração:

- Para receber resultados quantitativos, é importante homogeneizar toda a amostra de fezes pesada no tampão de extração. Evitar a contaminação no topo do tubo
  - componentes insolúveis (não digeridos) podem estar ainda no tubo depois da extração.
- Uma etapa curta de 5 minutos de centrifugação durante a extração pode dar como resultado uma solução turva. A turvação pode ser evitada com uma centrifugação mais demorada, mas não haverá influência na determinação quantitativa da técnica de ELISA.

Procedimento ELISA:

- No procedimento ELISA, a **etapa de lavagem é essencial** para garantir a reprodução dos resultados. Um **tempo mínimo de incubação** do tampão de lavagem nos poços de **pelo menos 20 segundos** deve ser garantido a cada medição. O **número de ciclos de lavagem** é obrigatório para garantir resultados reprodutíveis.
- Na utilização do **lavador automático**, BÜHLMANN recomenda enfaticamente que se use o “Modo de placa”, isto é, que cada etapa do processo (dispensação/ aspiração) seja realizada em todas as '*strips*' seqüencialmente, antes de passar para a próxima etapa de processo. Desta forma o tempo mínimo de incubação estará garantido.
- O número indicado de **ciclos de lavagens é** mandatório, para garantir resultados reprodutíveis.

- **O rotador (agitador) de placa** deve operar a 450 rpm (<10Hz). Uma frequência de rotação mais elevada pode causar uma linearidade de diluição mais insatisfatória nos valores entre 300/900 e 600/1800 µg/g. A rotação orbital deve ser usada em vez da agitação recíproca.
- Uma nova curva padrão deve ser gerada todas às vezes em que o teste for realizado. O alinhamento vertical é recomendado.
- Se a concentração inicial de uma amostra desconhecida apresentar um valor mais alto que o calibrador, a amostra deve ser diluída com o tampão de incubação e testada novamente de acordo com o procedimento de teste. O fator de diluição resultante deve ser levado em conta no cálculo dos resultados.

COLHEITA E ARMAZENAMENTO DE AMOSTRAS

São necessários 50 a 100 mg de amostra nativa de fezes para o procedimento de extração.
Colete amostras fecais em tubos lisos. Armazene as amostras refrigeradas a 2-8ºC por até 6 dias.
Os extratos permanecem estáveis por até (≥) 7 dias se refrigerados entre 2-8°C e por até (≥) 24 meses se mantidos a -20°C.

Importante: A amostra deve ser coletada sem a adição de qualquer produto químico ou biológico no dispositivo de coleta.

PADRONIZAÇÃO

O teste BÜHLMANN fCAL™ ELISA é calibrado contra MRP8/14 de granulócitos humanos.

PROCEDIMENTO DE TESTE

Extração

Procedimento padrão de extração

1. Marque com uma etiqueta e pese o tubo vazio de polipropileno (tara) junto com a alça de inoculação.
2. Retire 50 a 100 mg da amostra das fezes com a alça de inoculação e insira-a no tubo previamente tarado.
3. Estime o valor líquido da amostra, quebre a alça de inoculação e deixe a parte inferior da alça no tubo.
4. Adicione o tampão de extração segundo a fórmula

   x mg de fezes **x 49** = y µl tampão de extração

   (p.e. 50 mg da fezes + 2450 µl tampão de extração) no tubo e feche-o.
5. Homogeneíze a amostra num vortex multitubos com uma agitação vigorosa (na maior velocidade) durante 30 minutos.
6. Transfira o homogeneizado para um tubo Eppendorf de 2 mL e centrifugue numa minicentrífuga durante 5 minutos a 3.000 x g.
7. Leve o sobrenadante para um tubo fresco etiquetado e continue com o procedimento ELISA.

Procedimentos de extração usando dispositivos de extração fecal:
O procedimento de extração está descrito e ilustrado nas instruções de uso fornecidas com o respectivo dispositivo de extração.

1. **Dispositivo CALEX® Cap** (Código B-CALEX-C50/ B-CALEX-C200): Os tubos de extração são previamente preenchido com 5 mL tampão de extração.

   Importante: Depois da extração, centrifugue os tubos por 5 minutos a 500 x g e continue com o procedimento ELISA.
2. Dispositivo de extração fecal da Roche (Código 10745804 322) ou o BÜHLMANN **Smart-Prep** (Código: B-CAL-RD).
3. **ScheBo® Quick-Prep™** (Código B-CAL-SO50): Os tubos de extração são cheios previamente com tampão de extração.

   Importante: Depois da extração com Smart-Prep, o ScheBo® Quick-Prep™ centrifugue os tubos por 5 minutos a 3.000 x g. Ou então, transfira o homogeneizado para um tubo Eppendorf de 2 mL e centrifugue-o por 5 minutos a 3.000 x g. Decante o sobrenadante em um tubo novo e etiquetado, e continue com o procedimento ELISA.

FAIXA DE TRABALHO ELISA

O teste pode ser realizado de acordo com os seguintes procedimentos – faixa inferior ou estendida do procedimento ELISA. Qual procedimento a ser escolhido depende da concentração esperada de calprotectina das amostras. Para amostras até 600 µg/g escolha o faixa inferior do procedimento faixa de uso 10 – 600 µg/g. Se as amostras tendem a exceder 600 µg/g escolha o faixa estendida do procedimento faixa de uso 30 – 1800 µg/g.

PROCEDIMENTO ELISA

Importante: Permitir que os reagentes estejam entre 18-28 °C antes de usar.
Diluir apenas o extrato de fezes. Calibradores e controles estão prontos para o uso.

1. DILUIÇÃO DA AMOSTRA DE FEZES

Faixa de trabalho de 10-600 µg /g

1.1. **Procedura pesagem manual, Smart Prep ou ScheBo® Quick Prep™**: Diluir os sobrenadantes 1:50 com tampão de incubação (por exemplo: 20 µL do extrato e 980 µL de tampão de incubação) e misture bem. Deixe as amostras estabilizarem durante pelo menos 5 minutos a 18-28 °C antes de se prosseguir para a etapa 4c.

1.2. **Dispositivo CALEX® Cap**: Diluir os sobrenadantes 1:5 com tampão de incubação (por exemplo: 100 mL do extrato e 400 mL de tampão de incubação) e misture bem. Deixe as amostras estabilizarem durante pelo menos 5 minutos a 18-28 °C antes de se prosseguir para a etapa 4c.

Faixa de Trabalho 30-1800 µg/g

A faixa de trabalho pode ser estendida em 3 vezes, se você diluir as amostras de 1:7500 em vez de 1:2500. Recomenda-se este procedimento, se altas concentrações de calprotectina forem esperadas. Precisão e linearidade do ensaio permitem esta extensão para mensurar a faixa.

1.1. **Procedura pesagem manual, com Smart Prep ou ScheBo® Quick Prep™**: Diluir os sobrenadantes 1:150 com tampão de incubação (por exemplo: 20 µL do extrato e 2980 µL de tampão de incubação) e misture bem. Deixe as amostras estabilizarem durante pelo menos 5 minutos a 18-28 °C antes de se prosseguir para a etapa 4c.

1.2. **Dispositivo CALEX® Cap:** Diluir os sobrenadantes 1:15 com tampão de incubação (por exemplo: 50 µL do extrato e 700 µL de tampão de incubação) e

misture bem. Deixe as amostras estabilizarem durante pelo menos 5 minutos a 18-28 ℃ antes de se prosseguir para a etapa 4c.

2. Prepare uma placa com número suficiente de fileiras para testar o número necessário de calibradores, controles e amostras diluídas. Remova o excesso de fileiras do suporte e sele-as numa bolsa metalizada junto com pacotes desumidificadores sem demora. Armazene no refrigerador.
3. Lave duas vezes os poços recobertos usando pelo menos 300 µL de tampão de lavagem por poço. Esvazie os poços e bata a placa firmemente contra o papel absorvente.

Importante: Para cada uma das três etapas de lavagem, deve ser garantido um **tempo mínimo de incubação de pelo menos 20s para o tampão de lavagem** nos poços (Ver Cuidados Técnicos – Procedimento ELISA).

4a. Pipete 100 µL de tampão de incubação (bruto)

Pipete 100 µL de calibrador A-E nos respectivos poços.

4b. Pipete 100 µL de controles baixo e alto nos respectivos poços.

4c. Pipete 100 µL de cada amostra diluída nos poços subseqüentes.

5. Cubra a placa com um selador de placas e deixe incubar durante 30 ± 5 minutos em um rotador de placas a 450 rpm, a 18-28ºC (veja Cuidados Técnicos - Procedimento ELISA).
6. Remova e descarte o selador de placa. Esvazie os poços e lave três vezes usando pelo menos 300 µL de tampão de lavagem por poço (veja Cuidados Técnicos – Procedimento ELISA). Esvazie os poços e bata a placa firmemente no papel absorvente.
7. Pipete100 µL de Enzima em cada poço.
8. Cubra a placa com um selador de placas e deixe incubar por 30 ± 5 minutos em um rotador de placa a 450 rpm, a 18-28ºC.
9. Remova e descarte o selador de placas. Esvazie os poços e lave cinco vezes usando pelo menos 300 µL de tampão de lavagem por poço. Esvazie os poços e bata a placa firmemente contra o papel absorvente.

Importante: Dê tempo para que a solução de substrato TMB se equilibre a 18-28ºC.

10. Pipete 100 µL da solução de substrato TMB em todos os poços.
11. Cubra a placa com um selador de placas, proteja a placa da luz direta e deixe incubar por 15 ± 2 minutos em um rotador de placas a 450 rpm, a 18-28℃.
12. Pipete 100 µL de solução stop em todos os poços. Remova as bolhas de ar com uma ponta de pipeta. Prossiga com a etapa 13 dentro de 30 minutos.
13. Leia a absorvência a 450nm em um leitor de micro-titulador de placa.

RESULTADOS & CÁLCULOS

FAIXA DE USO 10 – 600 µg/g

Leia a absorbância de 450nm no leitor da microplaca para cada calibrador e controle da amostra usando um 4 PL que se encaixa no substrato branco para obter a amostra de calprotectina calculada.
Se você preferir o faixa inferior do procedimento ELISA, as seguintes concentrações de calibrador devem ser usadas no respectivo protocolo ELISA: **10, 30, 100, 300 e 600 µg/g de calprotectina.**
Fatores adicionais de diluição devem ser multiplicados com os resultados para obter os resultados finais.

Consulte a Table 19 e a Figure 1 para obter dados típicos (resultados e curva padrão). *Esses resultados e curva padrão são dados apenas para fins de demonstração. Uma curva padrão deve ser gerada para cada conjunto de amostras a serem testadas.*

FAIXA DE USO 30 – 1800 µg/g

Leia a absorbância de 450nm no leitor da microplaca para cada calibrador e controle da amostra usando um 4 PL que se encaixa no substrato branco para obter a amostra de calprotectina calculadas.

Se você preferir o procedimento ELISA de faixa inferior, as seguintes concentrações de calibrador devem ser usadas no respectivo protocolo ELISA: ***30, 90, 300, 900 and 1800 µg/g de calprotectina.***

Fatores adicionais de diluição devem ser multiplicados com os resultados para obter os resultados finais.

Consulte a Table 24 e a Figure 3 para obter dados típicos (resultados e curva padrão). Esses resultados e curva padrão são dados apenas para fins de demonstração. Uma curva padrão deve ser gerada para cada conjunto de amostras a serem testadas.

CARACTERÍSTICA DE DESEMPENHO

FAIXA DE USO: 10 – 600 µg/g

Características de desempenho do teste foram estabelecidas em duplicatas.

Precisão intra-teste: 4,7%. A precisão intra-teste foi calculada a partir de 20 pares de valores de 3 amostras fecais extraídas e testadas numa única batelada de acordo com o procedimento de teste. Os valores encontram-se na Table 20.

Precisão inter-testes: <15%. A precisão inter-testes do ELISA foi calculada a partir de 5 amostras fecais extraídas. As alíquotas foram testadas de acordo com o procedimento de teste em 10 bateladas e por três técnicos diferentes usando 2 lotes de kit e em dois laboratórios diferentes. Os valores encontram-se na Table 21.

Limite de detecção (LoB): <10 µg/g. Vinte duplicatas do tampão de incubação foram testadas em uma única batelada. Os desvios médios e padrão foram calculados para os valores de absorvência. A dose mínima detectável de calprotectina foi calculada de forma a estar claramente abaixo do calibrador A (10 µg/g) adicionando dois desvios padrões da absorvência média e fazendo a intersecção deste valor com a curva padrão obtida numa nova batelada.

Limite de detecção (LoQ): <10 g/g. Dez amostras fecais com valores entre 5,2 e 1254 µg/g de calprotectina foram testadas 20 vezes em duplicatas em um teste. O % CV e os valores médios foram calculados para cada amostra. A sensibilidade funcional foi observada em 15% CV. O perfil de precisão resultante (Figure 2) permite a medição precisa dentro de toda a faixa padrão de 10 a 600 µg/g.

Linearidade de diluição: 103%. Sete amostras fecais com valores elevados de calprotectina foram extraídas de acordo com o procedimento de teste. Os extratos foram diluídos com o tampão de incubação e subseqüentemente testados de acordo com o procedimento do teste. Os valores esperados foram calculados a partir do valor observado encontrado com a primeira diluição. Os resultados estão apresentados na Table 22.

Recuperação de picos: 100%. Duas amostras fecais extraídas foram acrescidas de diferentes quantidades de calprotectina diluída contendo soro humano. As amostras foram medidas antes e depois do acréscimo de acordo com o procedimento de teste, Os resultados estão apresentados na
Table 23.

Reatividade cruzada: <0,1%. Um tampão de incubação acrescido de diferentes volumes de recombinante MRP8 e MRP14 foi medido de acordo com o procedimento de teste. Os valores estão apresentados na Table 28.

FAIXA DE USO: 30 – 1800 µg/g
Precisão intra-teste: 4,0%. A precisão (média) intra-teste foi calculada a partir dos resultados de 20 duplicatas de 3 amostras de fezes extraídas e testadas num único lote de acordo com o procedimento de teste. Os valores são apresentados na Table 25.

Precisão Inter-testes: <15%. A precisão inter-testes do ELISA foi calculado a partir de 5 amostras extraídas de fezes. As frações foram testadas de acordo com os procedimentos de teste por 3 técnicos diferentes em 10 lotes diferentes usando 2 lotes de kit em 2 laboratórios diferentes. Os valores são apresentados na Table 26.

Limite de detecção (LoQ): <30 µg/g. 18 amostras fecais com valores entre 10.8 e 2080 µg/g de calprotectina foram medidos 20 vezes em um teste. O CV porcentual e os valores médios foram calculados para cada amostra. O LoQ foi observado a 15% do CV. O perfil de precisão resultante permite que a medição precisa dentro da faixa padrão de 30 a 1800 µg/g. Os resultados foram apresentados na Figure 4.

Linearidade da diluição: 102 %. Cinco amostras de fezes com concentrações elevadas de calprotectina foram extraídas de acordo com o procedimento de teste. Os extratos foram diluídos com tampão de incubação e subseqüentemente testados de acordo com o procedimento de teste. Os valores esperados foram calculados a partir do valor observado encontrado na primeira diluição. Os resultados foram apresentados na Table 27.

INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS

A avaliação da calprotectina fecal é uma forma confiável e fácil de distinguir doença orgânico das gastrointestinais funcionais.

Num estudo clínico, 401 pacientes sintomáticos previstos para colonoscopia foram investigados. Exames endoscópicos mostraram que dos 273 pacientes com doenças funcionais, 128 pacientes tinham diversas doenças orgânicas (colite, doença de Crohn, úlceras, diverticulite, pólipos, adenomas, câncer ou doenças infecciosas) (ref. 12).
A análise da curva (AUC: 0,935) característica de operação do receptor (COR) resultou em um corte clínico ótimo em 50 µg/g. Aplicando-se este corte, uma sensibilidade clínica e especificidade de 84,4% e 94,5% respectivamente podem ser obtidas na diferenciação entre doenças orgânicas e funcionais (veja Table 29).
Níveis de calprotectina fecal de adultos e crianças são comparáveis, ao passo que níveis de recém-nascidos podem ser significativamente maiores (ref. 8).
Esses dados apoiam a seguinte recomendação para interpretação de resultados:

Valores normais abaixo de 50 µg/g:
Valores de calprotectina <50 µg/g não são indicativos de inflamação no trato gastrointestinal. Pacientes com baixos níveis de calprotectina provavelmente não terão necessidade de procedimentos invasivos para determinar a causa da inflamação (ref. 12).

Valores elevados entre 50 e 200 µg/g:
Valores de calprotectina entre 50 e 200 µg/g podem indicar doenças orgânicas leves tais como inflamações causadas por NSAIDs (drogas anti-inflamatórias não esteroidais), diverticulite suave e IBD (doença inflamatória do intestino) em fase de remissão. A baixa resposta inflamatória mostrada dentro desta faixa pode sugerir que se repitam as medições em um curto prazo e seja realizado mais investigações.

Valores elevados acima de 200 µg/g:
Valores de calprotectina > 200 µg/g são indicativos de doença orgânica ativa com inflamação no trato gastrointestinal. Sugere-se procedimentos investigativos e curativos apropriados por especialistas.

O nível de corte sugerido para adultos (50 µg/g) podem também ser usados por crianças de 4 a 17 anos, independente de sexo (ref. 9).

CONTROLE DE QUALIDADE

Compreensão exaustiva desta instrução torna-se necessária para a utilização bem sucedida do produto. Resultados confiáveis serão obtidos somente com as técnicas precisas de laboratório e a correta utilização de um (Guia de Boas Praticas) seguindo com exatidão esta instrução de uso.
Como não existe controle da extração de calprotectina disponível comercialmente, recomenda-se o uso de uma amostra de extrações fecais positivas para controle de qualidade interno.
A reprodutibilidade dos parâmetros de curva padrão e valores de controle devem estar dentro dos limites estabelecidos de aceitabilidade do laboratório. Os limites de confiança para os controles são específicos de um lote e impressos numa folha de dados QC adicional.
Se a precisão do teste não satisfaz os limites estabelecidos e a repetição excluir erros na técnica, verifique os seguintes pontos: i) uso da pipeta, controle de temperatura e dispositivos de temporização. ii) ajustes do leitor ELISA. iii) datas de expiração de reagentes. iv) condições de armazenamento e incubação. v) Solução de substrato TMB deve ser incolor. vi) pureza da água..

LIMITAÇÕES DE DESEMPENHO

- Reagentes fornecidos com este kit estão sendo otimizados para determinação de calprotectina em amostras de fezes humanas.
- Resultados de teste devem ser interpretados em conjunto com as informações disponíveis da avaliação clínica do paciente e outros procedimentos de diagnóstico.

APPENDIX I

REFERENCES/ LITERATURREFERENZEN/ RÉFÉRENCES/ RIFERIMENTI/ REFERENCIAS

1. Striz I and Trebichavsky I: *Calprotectin – a pleiotropic molecule in acute and chronic inflammation*. Physiol Res. **53**, 245-253 (2004)
2. Tibble JA et al.: *Use of surrogate markers of inflammation and Rome criteria to distinguish organic from nonorganic intestinal disease*. Gastroenterol **123**, 450-460 (2002)
3. Fagerhol MK: *Calprotectin, a faecal marker of organic gastrointestinal abnormality.* Lancet **35**6, 1783-4 (2000)
4. Hessian PA and Fisher L: *The heterodimeric complex of MRP-8 (S100A8) and MRP-14 (S100A9). Antibody recognition, epitope definition and the implications for structure*. Eur J Biochem **268**, 353-63 (2001).
5. Goebeler M et al.: *Expression and complex formation of S100-like proteins MRP8 and MRP14 by macrophages during renal allograft rejection.* Transplantation **58**, 355-61 (1994).
6. Tibble JA et al.: *A simple method for assessing intestinal inflammation in Crohn's disease.* Gut 47, 506-513 (2000).
7. Wassell J et al.: *Faecal Calprotectin: a new marker for Crohn's disease?* Ann Clin Biochem **41,** 230-232 (2004)
8. Konikoff MR and Denson LA: *Role of fecal calprotec-tin as a biomarker of intestinal inflammation in inflam-matory bowel disease.* Inflamm Bowel Dis 12(6), 524-34 (2006)
9. Fagerberg UL et al.: *Colorectal inflammation is well predicted by fecal calprotectin in children with gastrointestinal symptoms.* J Pediatr Gastroenterol Nutr **40**, 450-5 (2005)
10. Johnson M W et al.: *Faecal calprotectin: a noninvasivee diagnostic tool and marker of severity in pouchitis.* Eur J Gastroenterol Hepatol 20 :174-179, 2008)
11. Sipponen T et al. *Faecal Calprotectin, Lactoferrin, and Endoscopic Disease Activity in Monitoring Anti-TNF-alpha Therapy for Crohn's Disease.* Aliment Pharmacol Ther **28**, 1221–1229, (2008)
12. Manz, M. et al. *Value of fecal calprotectin in the evaluation of patients with abdominal discomfort: an observational study.* BMC Gastroenterology **12**, 5 (2012).
13. Jahnsen J, Røseth AG, Aadland E*. Measurement of calprotectin in faeces*.. Tidsskr Nor Legeforen **128**, 743–5 (2008)

Table 19: **Example of Results**

	Conc. [µg/g]	Absorb. [OD]	Calc. Conc. [µg/g]	CV Conc [%]
Blank Avg.		**0.096**		
Cal A	10	0.073		
Cal A	10	0.066		
Cal A Avg.	**10**	**0.069**		**7.2**
Cal B	30	0.143		
Cal B	30	0.153		
Cal B Avg.	**30**	**0.148**		**4.8**
Cal C	100	0.465		
Cal C	100	0.456		
Cal C Avg.	**100**	**0.460**		**1.4**
Cal D	300	1.121		
Cal D	300	1.135		
Cal D Avg.	**300**	**1.128**		**0.9**
Cal E	600	1.658		
Cal E	600	1.671		
Cal E Avg.	**600**	**1.664**		**0.6**
Ctrl Low		0.201	41	
Ctrl Low		0.189	39	
Ctrl Low Avg.		**0.195**	**40**	**4.4**
Ctrl High		0.598	134	
Ctrl High		0.583	130	
Ctrl High Avg.		**0.590**	**132**	**1.8**

Figure 1: **Example of a Standard Curve**

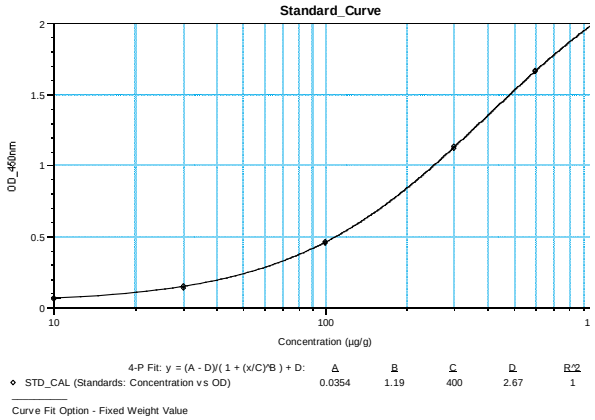

Standard_Curve
OD_460nm
Concentration (µg/g)
4-P Fit: y = (A - D)/(1 + (x/C)^B) + D:
STD_CAL (Standards: Concentration v s OD)
Curve Fit Option - Fixed Weight Value

Table 20: **Intra-Assay Precision**

Sample	Mean [µg/g]	SD [µg/g]	CV [%]
low	52.5	1.4	2.7
medium	173.8	5.6	3.2
high	408.5	33.0	8.1
Mean			**4.7**

Table 21: **Inter-Assay Precision**

Sample	Mean [µg/g]	SD [µg/g]	CV [%]
Sample 1	18.1	2.5	13.5
Sample 2	44.5	6.4	14.5
Sample 3	74.3	7.9	10.7
Sample 4	227	15.0	6.6
Sample 5	520	57.8	11.1
Mean			**11.3**

Figure 2: **Precision Profile**

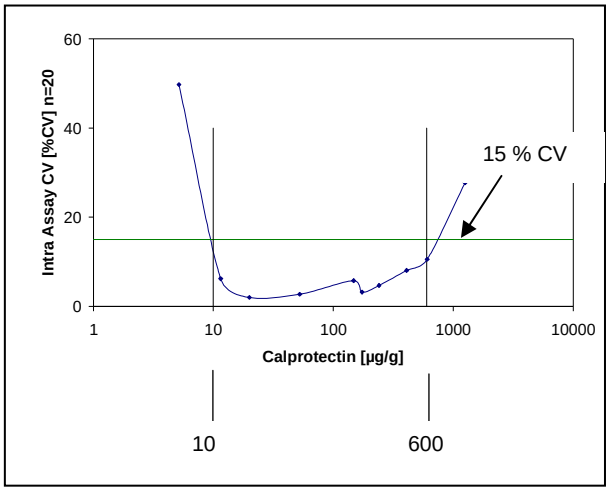


Table 22: **Dilution Linearity/Parallelism**

Sample	Dilution	Observed [µg/g]	Expected [µg/g]	O/E [%]
S 1	1:200	405	-	--
	1:400	182	202	90
	1:800	95	101	94
	1:1600	49	51	98
	1:3200	25	25	99
	1:6400	15.6	12.7	123
	1:12800	6.6	6.3	104
	Mean			**101**
S 2	1:50	232	-	--
	1:100	124	116	107
	1:200	61	58	106
	1:400	28	29	96
	1:800	12	15	86
	Mean			**98**
S 3	1:400	290	-	--
	1:800	145	145	100
	1:1600	73	72	100
	1:3200	39	36	106
	1:6400	19	18	103
	Mean			**103**
S 4	Mean			**100**
S 5	Mean			**124**
S 6	Mean			**88**
S 7	Mean			**106**
Mean				**103**

Table 23: **Spiking Recovery**

Sample	µg/g	spiked with [µg/g]	Observed [µg/g]	Expected [µg/g]	O/E [%]
S 1	5.3	10	13.6	15.3	88.9
		30	33.6	35.3	95.2
		100	101	105	96.1
		150	147	155	94.5
		300	287	305	94.1
		400	468	405	115.4
	Mean				**97.4**
S 2	24.6	10	32.9	34.6	95.1
		30	49.2	54.6	90.1
		100	139	125	111.5
		150	176	175	100.5
		300	358	325	110.3
		400	467	425	109.9
	Mean				**103**
Mean					**100**

Table 24: **Example of Results**

	Conc. [µg/g]	Absorb. [OD]	Calc. Conc. [µg/g]	CV Conc [%]
Blank Avg.		**0.057**		
Cal A	30	0.047		
Cal A	30	0.046		
Cal A Avg.	**30**	**0.047**		**0.9**
Cal B	90	0.138		
Cal B	90	0.140		
Cal B Avg.	**90**	**0.139**		**1.0**
Cal C	300	0.464		
Cal C	300	0.452		
Cal C Avg.	**300**	**0.458**		**1.9**
Cal D	900	1.207		
Cal D	900	1.192		
Cal D Avg.	**900**	**1.200**		**0.8**
Cal E	1800	1.627		
Cal E	1800	1.630		
Cal E Avg.	**1800**	**1.629**		**0.1**
Ctrl Low		0.147	105	
Ctrl Low		0.162	115	
Ctrl Low Avg.		**0.155**	**110**	**6.2**
Ctrl High		0.618	396	
Ctrl High		0.618	396	
Ctrl High Avg.		**0.618**	**396**	**0.6**

Figure 3: **Example of a Standard Curve**

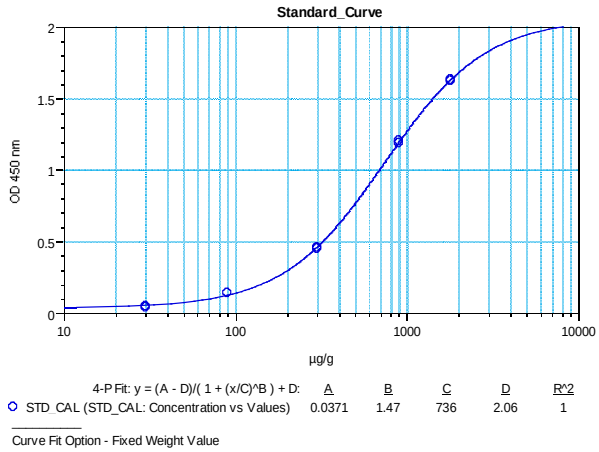

Standard_Curve
OD 450 nm
µg/g
4-P Fit: y = (A - D)/(1 + (x/C)^B) + D:
A B C D R^2
STD_CAL (STD_CAL: Concentration vs Values) 0.0371 1.47 736 2.06 1
Curve Fit Option - Fixed Weight Value

Table 25: **Intra-Assay Precision**

Sample	Mean [µg/g]	SD [µg/g]	CV [%]
Sample 1	37.7	2.5	6.7
Sample 2	713	20.1	2.8
Sample 3	1246	32.4	2.6
Mean			**4.0**

Figure 4: **Precision Profile**

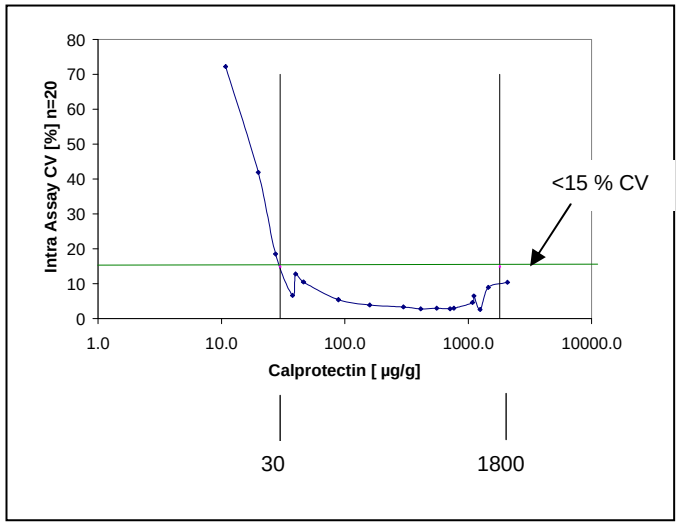


Table 26: **Inter-Assay Precision**

Sample	Mean [µg/g]	SD [µg/g]	CV [%]
Sample 1	75.5	9.7	12.8
Sample 2	225	20	8.8
Sample 3	788	62	7.8
Sample 4	1000	111	11.1
Sample 5	1764	221	12.6
Mean			**10.6**

Table 27: **Dilution Linearity/Parallelism**

Sample	Dilution	Observed [µg/g]	Expected [µg/g]	O/E [%]
S 1	1:225	2466	-	100
	1:350	1296	1585	82
	1:1200	420	462	91
	1:2400	237	233	102
	1:4800	111	116	96
	Mean			**92.6**
S 2	1:100	758	-	100
	1:120	702	632	111
	1:150	552	505	109
	1:200	406	379	107
	1:400	210	190	111
	1:800	108	95	114
	Mean			**111**
S 3	Mean			**105**
S 4	Mean			**101**
S 5	Mean			**99**
Mean				**102**

Table 28* **Cross Reactivity**

Spiked with	**MRP8** [ng/mL]	**MRP14** [ng/mL]
100 µg/mL	26.0	38.7
10 µg/mL	8.0	3.4
1 µg/mL	<4.0	<4.0
100 ng/mL	<4.0	<4.0
10 ng/mL	<4.0	<4.0

Table 29 (ref.12) **Clinical Study**

	Calprotectin (EK-CAL)	Lactoferrin
n	401	391
cut-off	50 µg/g	3 µg/mL
Sensitivity	84.4%	74.2%
Specificity	94.5%	91.0%
PPV	87.8%	79.3%
NPV	92.8%	88.4%
LR+	15.4	0.17
LR-	8.25	0.28

* Data have been established with the lower range ELISA procedure

Table description: cf. “Results”, “Performance Characteristics” and “Interpretation of Results”.

Tabellenbeschreibung: siehe Resultate “Leistungsmerkmale” und “Interpretation der Resultate”.

Explications aux tableaux: voir “Résultats”, “Caracteristiques de Performance” et “Interprétation des Résultats”.

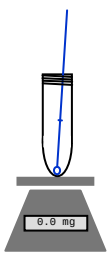
Descrizione tavola: *cf*. “Risultati”, “Caratteristiche di Prestazione” e “interpretazione dei resultati”.

Explicaciones a las Tablas: ver “Resultados”, “Características de Efficiencia”) y “Interpetaciones de los resultados.”

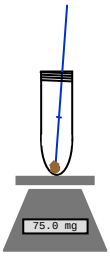
Explicação a Tablas: ver “Resultados”, “Características de desempenho” y “Interpretação do resultados

CALPROTECTIN EXTRACTION

Standard Extraction Procedure

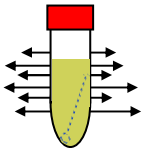


Pre-weigh empty tube
+ Inoculation loop

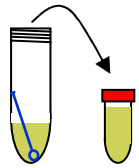


Weigh 50 to100 mg
faeces

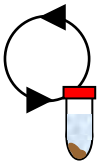
Add 49 volumes
of 1x B-CAL-EX



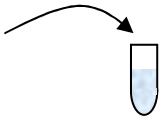
Close tube and
vortex vigorously
for 30 min



Transfer ~1.0 ml
into a fresh tube



Centrifuge 5 min
at 3'000 x g



Transfer supernatant into a fresh tube and continue with the lower or extended range ELISA procedure (1:50 or 1:150).

CALPROTECTIN ELISA

Precoated Microtiter Plate

↓ ↺ *wash 2 x*

100 µL Calibrators Controls
or diluted Samples

↓ ↺ *incubate 30 (+ 5) minutes*
at 18-28°C on a plate rotator

↺ *wash 3 x*

add 100 µL Enzyme Label

↓ ↺ *incubate 30 +/- 5 minutes*
at 18-28°C on a plate rotator

↺ ***wash 5 x***

add 100 µL TMB Substrate

↓ ↺ *incubate 15 +/- 2 minutes*
at 18-28°C on a plate rotator

add 100 µL Stop Solution

➡ **Read absorbance at 450 nm (within 30 minutes)**

TIME TO RESULT: 75 MINUTES

APPENDIX V
SYMBOLS/ SYMBOLE/ SYMBOLES/ SIMBOLI/ SIMBOLOS

Symbol	Explanation
	Use By Verwendbar bis Utiliser jusqu'au Utilizzare entro Fecha de caducidad Data de expiração
REF	Order Code Bestellnummer Code Codice Código Código
LOT	Batch code Chargenbezeichnung Code du lot Codice del lotto Código de lote Código lote
IVD	*In Vitro* Diagnostic Medical Device *In Vitro* Diagnostikum Dispositif médical de diagnostic *in vitro* Dispositivo medico-diagnostico *in vitro* Producto sanitario para diagnóstico *in vitro* Producto sánitario para diagnóstico *in vitro*
	Contains sufficient for <n> tests Ausreichend für "n" Ansätze Contenu suffisant pour „n" tests Contenuto sufficiente per „n" saggi Contenudo sufficiente para <n> ensayos Contenudo sufficiente para <n> tests
	Consult Instructions for Use- Gebrauchsanweisung beachten Consulter le mode d'emploi Consultare le istruzioni per l'uso Consulte las instrucciones de uso Leia cuidadosamente as instruções
	Temperature limitation Zulässiger Temperaturbereich Limites de température Limiti di temperatura Limite de temperatura Límite de temperatura
BUF EX	Extraction Buffer Extraktions-Puffer Tampon d'extraction Tampone per estrazione Tampón de extracción Tampão extração
MP	Microtiter plate Mikrotiterplatte Microplaque Micropiastra Microplaca Microplaca

Symbol	Explanation
BUF WASH 10X	Wash Buffer Concentrate (10x) Wasch-Puffer Konzentrat (10x) Concentré de tampon de lavage (10x) Tampone di lavaggio concentrato (10x) Tampón de lavado concentrado (x10) Concentrado de tampão de lavagem
BUF INC	Incubation Buffer Inkubations-Puffer Tampon d'incubation Tampone di incubazione Tampón de incubación Tampão de incubação
CAL A - CAL E	Calibrator A -E Kalibrator A -E Calibrateur A -E Calibratore A - E Calibrador A – E Calibrador A – E
CONTROL L	Control Low Kontrolle tief Contrôle bas Controllo basso Control bajo Controle baixo
CONTROL H	Control High Kontrolle hoch Contrôle élevé Controllo alto Control alto Controle alto
EL	Enzyme Label Enzym-Marker Marqueur enzymatique Marcato enzimatico Marcador enzimático Marcador enzimático
SUBS TMB	TMB Substrate TMB-Substrat Substrat TMB Substrato di TMB Substrato de TMB Substrato TMB
SOLN STOP	Stop Solution Stopp-Lösung Solution stop Soluzione stoppante Solución de parada Solução stop

CALEX® is a registered trademark of BÜHLMANN in many countries of the world.

CE

Zertifiziertes Managementsystem SQS ISO 9001 / ISO 13485

IVD

Printing Date
2014-08-15